

Universitat de Lleida

# TREBALL FINAL DE GRAU



ESCOLA  
POLITÀCNICA SUPERIOR  
UNIVERSITAT DE LLEIDA  
INSPIRING THE FUTURE

**Estudiant:** Adam Gabarró Alcaraz

**Titulació:** Grau en Enginyeria Química

**Títol de Treball Final de Grau:** Detecció i caracterització d'antibiòtics  $\beta$ -lactàmics en poblacions microbianes a través de tècniques analítiques (HPLC-UV-Vis)

**Director/a:** Dra. Anna Bacardit i Dr. Lluís Ollé

Presentació

Mes: Juny

Any: 2021

## Resum

Aquest treball de final de grau experimental, té la intenció de detectar diversos antibiòtics en mostres microbianes d'origen natural a través d'instruments analítics.

Durant el llarg del treball es presenta de manera ordenada tots els conceptes necessaris, tant teòrics com pràctics, per entendre de manera global tots els procediments que s'utilitzen en la part experimental.

Així doncs, durant el treball i des d'un marc experimental, es troben definits tots els conceptes referents a: teoria d'antibiòtics tenint en compte naturalesa, composició, estructura química i caracterització, teoria dels fongs i estructura, teoria de les tècniques analítiques i elecció de la més adequada per tal d'acollir tots els coneixements necessaris per entendre la naturalesa del treball.

A la darrera part del projecte, es poden consultar els resultats experimentals i contingut més pràctic del projecte.

## Agraïments

Una vegada arribats aquest punt, mirant cap endarrere i encara que costi de creure, es tanca una etapa important i en comença una altre d'encara més important.

M'agradaria agrair el suport i ajuda dels meus pares Gràcia Alcaraz i Pere Gabarró per confiar en mi, i poder recolzar aquesta etapa universitària que he intentat portar de la millor manera possible. També m'agradaria mencionar als meus germans Bern i Otger Gabarró, per tots els moments bons i dolents que em passat durant aquests 4 anys.

En destaco tota la gent i professors, que m'ha intentat ajudar durant aquesta etapa, tot i la gent que he deixat endarrere, n'hi ha d'altre que en destaca per la seva bona voluntat.

M'agradaria fer menció a la Dra. Anna Bacardit pel suport i recolzament al llarg del projecte, al Dr. Lluís Ollé per obrir-me les portes al món de la bioquímica, i per últim a la Dra. Sílvia Sorolla per acompanyar-me en el tram final del projecte.

**En especial aquest treball està dedicat a Neus Calvet, la meva iaia, que durant aquest últim any ha superat reptes molt més difícils que treure's un grau Universitari.**

**23 de juny de 2021**

## Antecedents

Els documents que han reforçat els fonaments del treball en el marc teòric i els conceptes claus pel marc pràctic han sigut els següents:

La font d'informació més important i substancial del treball, que alhora cobreix tots els camps d'interès d'aquest, és la memòria per optar al grau de doctor presentada per Benito Peña, M.E; (2006) *“Desarrollo y validación de métodos analíticos basado en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en muestras de interés agroalimentario y mediambiental”*, per la que s'exposen de manera extensa i precisa, múltiples conceptes referents als diferents mètodes analítics per la detecció de diferents analits, entre els quals es mencionen els antibiòtics i els seus derivats. (5)

Per consolidar la basant teòrica de les diferents tècniques analítiques plantejades com a possible solució per la detecció de les molècules desitjades, són d'interès els dos llibres de HOBART H. WILLARD; LYNNE L. MERRIT, JR; FRANK A. SETTLE, JR- *“Métodos instrumentales de análisis”*- University of Michigan, Indiana University, University of Tennessee at Knoxville, Virginia Military Institute- Grupo Editorial Iberoamérica (1991) i el llibre de DOUGLAS A. SKOOG; F. JAMES HOLLER, TIMOTHY A. NIEMAN- Stanford University, University of Kentucky, University of Illinois en Urbana-Champaign- Principios de Análisis instrumental (Quinta Edición)- Editorial McGraw Hill (2001), pel que expliquen extensament tota la teoria necessària per arribar a comprendre qualsevol tècnica analítica que compregui d'instruments analítics per la culminació de l'anàlisi. (9) (13)

Un segon treball, corresponent als senyors/es Sánchez M, Avilés, M ; González, L ; Ramírez, N (2011), que van realitzar la proposta de *“Proyecto: Identificación de compuestos orgánicos emergentes: desarrollo e implantación de metodologías para análisis por cromatografía de líquidos o gases”*, per la que es presenten múltiples tècniques d'anàlisi de compostos químics, entre les quals trobem la detecció d'antibiòtics (amoxicilina i diclofenaco “diclofenac”), per la que marca les línies directòries que pot seguir aquest treball de final de grau, referent a la part experimental. (10)

Reforçant el projecte anteriorment mencionat, els autors Talero-Pérez,V; Julio,O ; Rozo-Núñez, W; (2014) pel que presenten l'article de *“Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos sulfonamidas, quinolonas y clorafenicol”* on es torna a mencionar la utilització d'equips cromatogràfics i detectors de masses per la caracterització d'antibiòtics, i que pot ampliar l'elecció del tipus de tècnica pel cas en qüestió, i donar un ventall d'opcions més grans pel que fa a la part experimental. (11)

Paral·lelament amb els altres dos projectes, és notori (degut a la projecció de definicions de tècniques analítiques i la presentació de resultats de manera pràctica), l'article publicat per Rosa Zambrano, P.E; Espinoza, J,A; Conte-Júnior, C.A; Lázaro de la Torre, C.A. (2018). *“Determinación de residuos antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida”*,

per la que permet aclarir els diferents conceptes teòrics referents a les tècniques analítiques de cromatografia líquida acoblada a espectre de masses, que a l'hora permet ajustar quina de les tècniques cromatogràfiques és més acurada per determinar el tipus d'antibiòtics (12)

Un altre treball que permet agafar una visió general i teòrica referent al món dels antibiòtics, és treball de final de grau presentat per López Gallego, C; *"Trabajo de fin de grado, desarrollo de antibióticos a lo largo del siglo XX: resistencias y estrategias"*, que permet complementar la part teòrica referent a la naturalesa i propietats dels antibiòtics. (2)

Per acabar de definir molecularment els diferents tipus d'antibiòtics s'ha de tenir en compte, degut a la seva extensa informació, el llibre *"Antimicrobianos en medicina"* (1999), on s'exposen de manera extremadament precisa i extensa tots els grups i subgrups dels diferents tipus d'antibiòtics, exposant-ne la seva estructura química, mecanismes d'acció, mecanismes de resistència, espectre antibacterià, farmacocinètica, toxicitat, incompatibilitats i indicacions terapèutiques de les diferents molècules, per la que serà la font d'informació principal referent als antimicrobians. (3)

La part específica al creixement de les poblacions de fongs, es veu encabit en els dos articles, presentats per Buendía-Espinoza, J.C; Álvarez-Sánchez M.E; Mateo-Gúzman N; Bandalá Muñoz V,M; Maldonado-Torres, R; *"Modelo logístico de la dinámica de crecimiento micelial del hongo 'Totocozcatl' en medios de cultivo"* i l'altre font d'informació és un fragment extret del "Manual de micologia general", per la que proporcionaran la part teòrica referent al creixement, aïllament i condicions de treball per la població de fongs utilitzada en aquest treball en qüestió.

Seguint als documents amb informació útil per la utilització de la tècnica analítica adequada pel cas en qüestió, cal destacar-ne el treball publicat per Carmona Alvarado, I.F (2015), *"Determinación de antibióticos en Fuentes de abastecimiento de agua superficial del área metropolitana, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV-F"*, on s'exposa que per la detecció de la família de la Penicil·lina i derivats (Amoxicilina) la tècnica més adequada és la cromatografia líquida, que ajuda a discernir una tècnica o altre.

Per acollir tota la part microbiològica i l'estreta relació entre el creixement de fongs amb la síntesis d'antibiòtics, serveix el llibre de *"Biología de los Microorganismos"* (1998). MADIGAN, M.T; MARTINKO J.M; PARKER, J. - Prentice Hall – 8ª edición revisada, pel que s'especifica de manera biològica la síntesis dels antibiòtics, i es concreten els anàlegs als factors de creixement de les poblacions, i es defineixen des de diferents nivells els tipus de fongs. També es menciona tot el tema referent a la resistència als antibiòtics. (pàgina 775)

## Abstract

This experimental final project is intended to detect various antibiotics in microbial samples of natural origin through analytical instruments.

Throughout the work, all the necessary concepts, both theoretical and practical, are presented in an orderly manner, in order to understand in a global way all the procedures used in the experimental part.

Thus, throughout the work and from an experimental framework, all the concepts are defined referring to: theory of antibiotics taking into account its nature, composition, chemical structure and characterization, theory of fungi and structure, theory of analytical techniques and selection of the most appropriate in order to accommodate all the knowledge necessary to understand the nature of the work.

In the last part of the project, you can consult the experimental results and practical content of the project.

## Índex

<b>Resum .....</b>	<b>2</b>
<b>Agraïments .....</b>	<b>3</b>
<b>Antecedents.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Índex de figures.....</b>	<b>10</b>
<b>Glossari.....</b>	<b>14</b>
<b>Objectius.....</b>	<b>15</b>
<b>Introducció.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Teoria .....</b>	<b>17</b>
1.1 <i>Introducció històrica .....</i>	<i>17</i>
<b>2. Teoria dels antibiòtics.....</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Antibiòtics.....</i>	<i>19</i>
2.1.1 <i>Antibiòtics <math>\beta</math>-lactàmics. ....</i>	<i>20</i>
2.1.2 <i>Acció antimicrobiana dels antibiòtics .....</i>	<i>27</i>
<b>3. Tècniques analítiques .....</b>	<b>29</b>
3.1 <i>Cromatografia líquida amb detector Ultravioleta-Visible (HPLC-UV-VIS) .....</i>	<i>29</i>
3.1.1 <i>Instrumentació HPLC .....</i>	<i>29</i>
<b>4. Fongs .....</b>	<b>35</b>
4.1 <i>Estructura dels fongs .....</i>	<i>35</i>
4.2 <i>Cicle de vida dels fongs .....</i>	<i>35</i>
4.3 <i>Fongs en el cas experimental .....</i>	<i>37</i>
4.4 <i>Biosíntesis teòrica de la Penicil·lina per Penicillium chrysogenum .....</i>	<i>40</i>
<b>5 Part experimental .....</b>	<b>41</b>

<i>5.1 Introducció a la part experimental</i> .....	41
<i>5.2 Creixement</i> .....	42
<i>5.3 Reproducció</i> .....	42
<i>5.4 Mètode operatiu de caracterització d'antibiòtics</i> .....	46
<i>5.5 Resultats experimentals</i> .....	50
5.5.1 Cromatograma i espectres UV .....	50
<i>5.6 Concentracions i ràtios de síntesis d'antibiòtics</i> .....	59
<b>Conclusions</b> .....	61
<b>Seguiment de la part experimental</b> .....	64
<b>Bibliografia i webgrafia</b> .....	65
<b>Annexes</b> .....	68
<i>Annex I: Observacions a través del microscopi electrònic</i> .....	68
Annex I.I Observacions microscòpiques població R21-22 .....	68
Annex I.II Observacions microscòpiques població R23-24 .....	70
Annex I.III: Observacions microscòpiques població R27-28 .....	71
Annex I.V Observacions microscòpiques població R29-30.....	73
<i>Annex II: Fitxa tècnica patró Procaine Benzylpenicillin CRS Batch 4</i> .....	74
<i>Annex III: Especificacions tècniques dels mètodes cromatogràfics</i> .....	76
Annex III.I : Condicions d'assaig per la detecció de Penicillin G Procaine Salt Monohydrate (Sigma-Aldrich) .....	76
<i>Annex IV: Resultats experimentals: cromatogrames i espectres UV</i> .....	78
Annex IV.I Cromatograma i espectres UV de la recta de calibratge .....	78
Annex IV.II Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R21 .....	87
Annex IV.III Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R22 .....	88
Annex IV.IV Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R23 .....	91
Annex IV.V Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R24 .....	93
Annex IV.VI Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R25 .....	95
Annex IV.VII Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R26 .....	97
Annex IV.VIII Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R27 .....	99
Annex IV.IX Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R28 .....	100



---

Annex IV.X Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R29 .....	102
Annex IV.XI Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R30 .....	105

## Índex de figures

Figura 1: Evolució en la producció d'antibiòtics a nivell mundial en diferents dècades. Font: QUIÑONES, D, Resistencia Antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud” (2017).....	17
Figura 2: Molècula de Penicil·lina genèrica, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	19
Figura 3: Estructura de l'anell betalactàmic, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	21
Figura 4: Anell betalactàmic tipus Penicil·lina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	22
Figura 5: Molècula de Bencilpenicil·lina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org.....	22
Figura 6: Àcid 6-aminopenicilànic (6-APA) , Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	23
Figura 7: Penicil·lina G, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	24
Figura 8: Procaïna bencilpenicilina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	24
Figura 9: Procaïna, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org.....	25
Figura 10: Penicil·lina benzatínica, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	25
Figura 11: Penicil·lina V, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	26
Figura 12: Molècula de Nafcilina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	26
Figura 13: Molècules d'amoxicilina i ampicilina respectivament, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	27
Figura 14: Esquema de l'acció dels antibiòtics sobre un bacteri, Font: Síntesis de antibióticos-Creative Biolabs Antibody-drug Conjugate (2015).....	28
Figura 15: Esquema de funcionament d'un cromatògraf líquid, Font: Departament d'Enginyeria Química Universitat d'Alacant – Cromatografia de líquids d'alta resolució (2019) .....	31
Figura 16: Estructura de la sílice, Font: LEBEDEV, A- 123RF (2021) .....	32
Figura 17: Cel·la del detector UV en HPLC, Font: Departament d'Enginyeria Química Universitat d'Alacant – Cromatografia de líquids d'alta resolució (2019).....	33
Figura 18: Diagrama d'un detector UV-Vis, Font: Detectores UV/UV-Vis- HITACHI Inspire the next (2021) .....	34

Figura 19: Esquema d'un detector de díodes, Font: DOLAN, J – Detectores Ultravioleta- Solutions for separation scientists (2016) .....	34
Figura 20: Cicle vital dels fongs, Font: GONZÁLEZ, C- Ciclo de vida- Hongos (2005) .....	36
Figura 21: Imatge de Penicillium Chrysogenum inoculat en un cultiu a través microscopi electrònic, Font: MARIJKE, AH – Research Gate (2006) .....	38
Figura 22: Ruta de biosíntesis de la Pencil·lina , Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org .....	40
Figura 23: Cultiu mostra R21-22 en etapa inicial, Font: Elaboració pròpia .....	43
Figura 24: Cultiu mostra R21-22, Font: Elaboració pròpia .....	43
Figura 25: Cultiu mostra R23-24 en etapa inicial, Font: Elaboració pròpia .....	44
Figura 26: Cultiu mostra R23-24, Font: Elaboració pròpia .....	44
Figura 27: Cultiu mostra R25-26, Font: Elaboració pròpia .....	45
Figura 28: Cultiu mostra R27-28 en etapa inicial, Font: Elaboració pròpia .....	45
Figura 29: Cultiu de la mostra R27-28, Font: Elaboració pròpia .....	46
Figura 30: Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC) model Waters 2695 Alliance 2 Separations Module amb detector UV-Vis (DAD) Diode Array Detector, Font: Elaboració pròpia .....	47
Figura 31: Exemple del cromatograma esperat del patró de PenG, Font: Elaboració pròpia .....	51
Figura 32: Cromatograma Bencilpenicilina Procaïna 10mg/L, Font: Elaboració pròpia .....	52
Figura 33: Espectre UV-Visible Bencilpenicilina Procaïna 10mg/L, Font: Elaboració pròpia .....	53
Figura 34: Gràfica de la recta de calibratge del patró de PenG, Font: Elaboració pròpia .....	54
Figura 35: Cromatograma mostra R30, Font: Elaboració pròpia .....	56
Figura 36: Espectre UV-Visible R30, Font: Elaboració pròpia .....	57
Figura 37: Observació mostra R21-22 ( N° augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	68
Figura 38: Observació mostra R21-22 ( N° augments 10 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	68
Figura 39: Observació mostra R21-22 ( N° augments 10 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	69

Figura 40: Observació mostra R21-22 ( N° augments 4 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	69
Figura 41: Observació mostra R23-24 ( N° augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	70
Figura 42: Observació mostra R23-24 ( N° augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	70
Figura 43: Observació mostra R27-28 ( N° augments 6,3 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	71
Figura 44: Observació mostra R27-28 (N° augments 6,3 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	71
Figura 45: Observació mostra R27-28 (N° augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	72
Figura 46: Observació mostra R27-28 (N° augments 6,3 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	72
Figura 47: Observació mostra R29-3 (0N° augments 10 x 5), Font: Elaboració pròpia .....	73
Figura 48: Cromatograma patró blanc .....	78
Figura 49: Espectre UV patró blanc .....	79
Figura 50: Cromatograma patró Bencilpenicilina Procaïna 1mg/L .....	80
Figura 51: Espectre UV-Visible patró Bencilpenicilina Procaïna 1mg/L .....	81
Figura 52: Cromatograma patró Bencilpenicilina Procaïna 2mg/L .....	82
Figura 53: Espectre UV-Visible patró Bencilpenicilina Procaïna 2mg/L .....	82
Figura 54: Cromatograma patró Bencilpenicilina Procaïna 5mg/L .....	83
Figura 55: Espectre UV-Visible Bencilpenicilina Procaïna 5mg/L .....	84
Figura 56: Cromatograma Bencilpenicilina Procaïna 10mg/L .....	85
Figura 57: Espectre UV-Visible Bencilpenicilina Procaïna 10mg/L .....	86
Figura 58: Cromatograma mostra R21 .....	87
Figura 59: Espectre UV-Visible mostra R21 .....	88
Figura 60: Cromatograma mostra R22 .....	89
Figura 61: Espectre UV-Visible mostra R22 .....	90
Figura 62: Cromatograma mostra R23 .....	91

Figura 63: Espectre UV-Visible mostra R23 .....	92
Figura 64: Cromatograma mostra R24 .....	93
Figura 65: Espectre mostra R24 .....	94
Figura 66: Cromatograma mostra R25 .....	95
Figura 67: Espectre UV-Visible mostra R25 .....	96
Figura 68: Cromatograma mostra R26 .....	97
Figura 69: Espectre UV-Visible mostra R26 .....	98
Figura 70: Cromatograma mostra R27 .....	99
Figura 71: Espectre UV-Visible mostra R27 .....	100
Figura 72: Cromatograma mostra R28 .....	101
Figura 73: Espectre UV-Visible mostra R28 .....	102
Figura 74: Cromatograma mostra R29 .....	103
Figura 75: Espectre UV-Visible mostra R29 .....	104
Figura 76: Cromatograma mostra R30 .....	106
Figura 77: Espectre UV-Visible R30 .....	107

## Glossari

HPLC: Cromatografia Líquida d'Alta resolució / High Performance Liquid Chromatography

UV-Vis: Ultravioleta-Visible

LC: Cromatografia líquida / Liquid Chromatography

GC/MS: Cromatografia gas - Espectrometria de masses / Gas Chromatography - Mass Spectrometry

6-APA: Àcid 6-aminopenicilànic

AA: Aminoàcids

ACV: Tripèptid lineal  $\delta$ -(L- $\alpha$ - aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina

DMF: 2,5-Dimetil furà

DMSO: Dimetil sulfòxid

DCI: Bencilpenicil·lina Procaïna

PenG: Penicil·lina G

AFMP: Àcid Fenoximetilpenicil·línic

DAD: Detector de Matriu de Díodes - Diode Array Detector

## Objectius

L'objectiu global del present treball de final de grau és **determinar la presència o no presència d'antibiòtics en poblacions de fongs a partir de matrius alimentàries** i la posterior elucidació de la molècula orgànica a partir dels resultats experimentals obtinguts a través dels instruments analítics adequats. Pel cas específic s'utilitza cromatografia líquida d'alta resolució i detector Ultraviolat-Visible.

Paral·lelament, i com a objectius secundaris, també es busca la familiarització amb el món dels antibiòtics i contacte experimental amb els instruments analítics del laboratori instrumental, motiu pel qual es pretén fer una recerca profunda referent a la teoria molecular dels antibiòtics, i trobar el punt d'unió entre els coneixements teòrics adquirits en la part pràctica del treball i els experimentals del projecte.

Per tal d'assolir els objectius globals del treball, s'han d'aconseguir els següents objectius específics:

- Estimar les possibles poblacions de fongs i tipus d'antibiòtics que se'n poden derivar de la matriu seleccionada, dissenyar-ne les condicions de creixement i escollir una possible tècnica analítica que permeti fer-ne la detecció.
- Entendre l'estructura i funcionament bioquímic dels antibiòtics, així com la seva biosíntesis i acció antimicrobiana.
- Extreure la població de fongs de la matriu alimentària, i aconseguir-ne un desenvolupament substancial per tenir una bona reproductibilitat pels posteriors anàlisis.
- Acotar correctament les diferents variables derivades dels instruments analítics, per aconseguir un rang de detecció de diferents antibiòtics el més gran possible.
- Distingir el tipus de molècula orgànica detectada a través dels resultats experimentals.
- Quantificar la presència d'antibiòtics en les diferents matrius.

## Introducció

De manera indirecta i pràcticament invisible, els antibiòtics i la indústria farmacèutica fan de pilar fonamental de la societat actual. És de desconeixença, que aquest pilar es veu amenaçat per les noves resistències que adquireixen els bacteris i microorganismes, degut a un ús indiscriminat i descontrolat dels antibiòtics i la resta de medicaments pel conjunt de la població.

La finalitat d'aquest treball de final de grau, és exposar el potencial de les poblacions de fongs, per ser una eina en el futur de la "nova" síntesis d'antibiòtics, que a hores d'ara es veu amenaçada per la creixent resistència als antibiòtics que comencen a presentar múltiples bacteris.

A més a més, també es vol evidenciar que el desenvolupament de nous antibiòtics es poden fer en matèries primeres recurrents com ara aliments completament assequibles, que permetran un previ creixement de les poblacions de fongs. Aquests últims, serviran de principals actors de la síntesis d'antibiòtics.

L'aportació experimental del treball, és la d'aplicació de les diferents tècniques analítiques per la detecció de les molècules antimicrobianes infrautilitzades per la indústria, dels que se'n podria seguir un estudi i escalar la producció a nivell industrial. L'enginyeria química pretén ser un pilar indispensable per la indústria farmacèutica, i en aquest treball es vol evidenciar l'estreta relació entre les tècniques analítiques i la producció industrial posterior, per la que agafa protagonisme l'enginyeria de procés i enginyeria química.

De manera secundària, el treball també vol exposar la percepció de la magnitud i rang de treball de la enginyeria química, per la que compta des de la síntesis de nous productes pel que passa per la detecció a través de les tècniques analítiques amb volums de mostra ínfims; fins la producció, control i viabilitat econòmica de processos industrials amb milers de tones de productes resultants.



## 1. Teoria

### 1.1 Introducció històrica

El tractament de les infeccions en humans, es porta estudiant des de l'antiguitat, ja sigui per utilització d'extractes de plantes medicinals, fins a fongs que creixien en alguns tipus d'aliments làctics.

Es considera que a la Història dels antibiòtics comença a l'any 1928 quan Alexander Fleming, va descobrir accidentalment la penicil·lina.

Des de la síntesis del primer antibiòtic, la *penicil·lina* (sintetitzada per la família de fongs ***Penicillium***), aquests han sigut els primers protagonistes per lluitar contra múltiples malalties letals, pel que han salvat milions de vides des de la dècada dels anys 40.

La generalització de l'ús d'antibiòtics es va propiciar als anys 50, que va significar una gran revolució al llarg de la 2<sup>a</sup> guerra mundial, per la que moltes malalties fins al moment mortals (com tuberculosi, pneumònia, septicèmia) van deixar de ser tant letals.

L'ús prolongat dels antibiòtics ha derivat a una resistència selectiva de certes poblacions de microorganismes contra aquests. El propi antibiòtic no indueix a la resistència, simplement selecciona. Acaba sent una interferència del procés de selecció natural, on només sobreviuran les soques amb variants capaces de resistir les concentracions d'antibiòtics del medi. Paral·lelament, aquestes resistències només es veuen adquirides per mutacions aleatòries de les bacteries. Sobre aquesta mutació, actua la selecció natural, i el punt més important a destacar, és que també existeixen **transferències de material genètic d'unes bacteries a altres**.

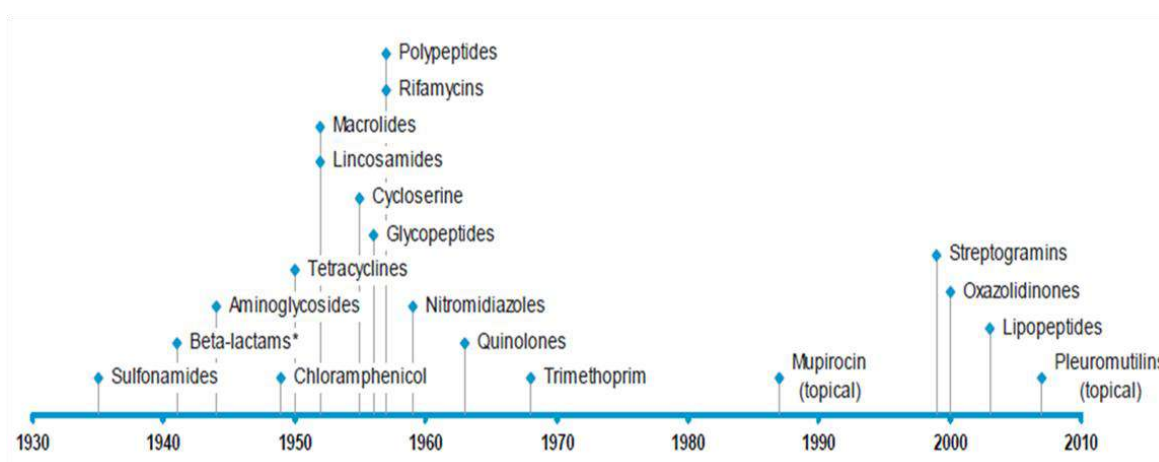


Figura 1: Evolució en la producció d'antibiòtics a nivell mundial en diferents dècades. Font: QUIÑONES, D, Resistencia Antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud" (2017)

El problema més imminent i seriós, ve donat per la multi resistència, on una mateixa població de bacteris, són resistents a més d'un tipus d'antibiòtic.

En l'actualitat, la síntesis dels 'nous antibiòtics' passa per seqüenciar els tipus de genomes dels fongs que siguin propensos a sintetitzar antibiòtics i/o compostos bioactius, on s'accepta a nivell mèdic que al llarg d'un número determinat d'anys, un número definit de bacteries agafaran resistències als antibiòtics sintetitzats durant aquest període de temps. (1) (2)

## 2. Teoria dels antibiòtics

### 2.1 Antibiòtics

Segons la RAE un antibiòtic és “la substància produïda per un ésser viu o fabricada per síntesis, capaç de paraitzar el desenvolupament de certs microorganismes patògens, per la seva acció bacteriostàtica o de causar la mort d'aquests, per la seva acció bactericida”.

Els antibiòtics són compostos d'interès mèdic i farmacèutic que permeten eliminar o inhibir el creixement de les bactèries.

El factor més important a destacar-ne d'aquests compostos, és la **toxicitat selectiva**, ja que presenten major activitat contra els organismes invasors, que respecte als organismes hoste que ingereixin l'antibiòtic. Els antibiòtics, agrupen totes les molècules orgàniques que tenen una acció envers a microorganismes patògens. (1) (3)

L'antibiòtic més comú i utilitzat és la Penicil·lina.

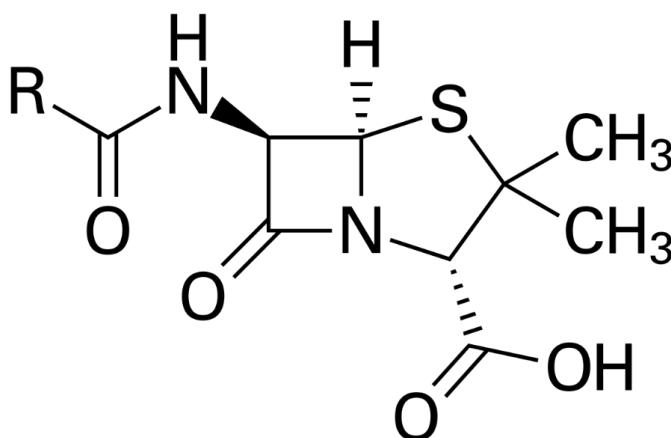


Figura 2: Molècula de Penicil·lina genèrica, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

La família de la que en deriven aquests tipus d'antibiòtics més comuns és la **Penicillium**. Altres famílies d'interès farmacèutic és la dels Streptomyces, per la que permet sintetitzar antibiòtics naturals com ara: tetraciclins, estreptomícines i eritromicina.

De manera generalitzada, es troben tres tipus d'antibiòtics, segons l'impacte que efectuen els humans en la seva síntesis.

- **Antibiòtics naturals:** la síntesis estructural d'aquesta antibiòtics, és d'origen natural, és a dir, un fong o bacteri (segons el seu procés bioquímic), tindrà com a producte o subproducte, l'antibiòtic, i aquest només haurà de ser aïllat i purificat del medi en què s'obtingui.
- **Antibiòtics semi-sintètics:** És comú també, l'extracció d'antibiòtics a partir de diferents microorganismes, i una posterior millora en els laboratoris, per la que en deriven els antibiòtics semi-sintètics. Un exemple és la ampicil·lina, que és el resultat de la modificació química de la penicil·lina.
- **Antibiòtics sintètics:** Com a últim grup es troben els antibiòtics sintètics, com les sulfamides, que són compostos sintetitzats a un laboratori, sense derivar de substractes naturals.

Els antibiòtics, segons la naturalesa estructural, es poden classificar de manera genèrica per diferents famílies:

1.  $\beta$ -lactames
2. Aminoglucòsids
3. Macròlids
4. Tetraciclins
5. Ansamicines

Tot i així, per aquest projecte només són d'interès els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, i específicament els Penicil·línics.

### 2.1.1 Antibiòtics $\beta$ -lactàmics.

Els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics són el tipus de molècules que inhibeixen la  $\beta$ -lactamasa, i es caracteritzen per contenir un anell  $\beta$ -lactàmic a l'estructura molecular.

L'anell  $\beta$ -lactàmic bé definit per un heterocicle de quatre àtoms que tenen un oxigen en posició  $\beta$  amb relació al nitrogen de la lactama ( $O=C-N$ ), pel que realment és un anell azetidinona (azetidin-2-ona).

La naturalesa dels seus radicals essencials que s'uneixen a l'anell  $\beta$ -lactàmic com a cadena lateral, defineix es diferents classes d'antibiòtics d'aquesta família.

L'anell  $\beta$ -lactàmic en si, té poca activitat antimicrobiana, necessita de l'activació per altres radicals. Aquests radicals normalment solen ser anells heterocíclics que estiguin fusionats o condensats amb l'anell  $\beta$ -lactàmic pel nitrògen 1 i carboni 4.

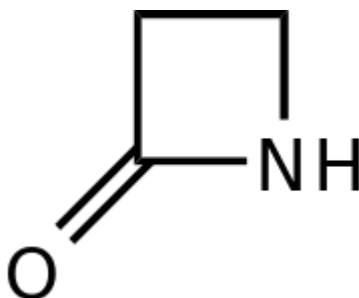


Figura 3: Estructura de l'anell betalactàmic, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

El propi nucli  $\beta$ -lactàmic és l'element estructural fonamental per l'activitat biològica dels antibiòtics, on per la seva transformació metabòlica o alteració química d'aquest, és pel qual es perd l'acció bacteriana. El seu mecanisme d'acció, és la inhibició de la última etapa de síntesis de la paret cel·lular bacteriana (**ampliació del procés a la pàgina 27**)

#### 2.1.1.1 Penicil·lines

Les penicil·lines són els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics derivats de l'anell àcid 6-aminopenicilànic, estructura que deriva de la condensació d'una molècula de valina i una de cisteïna, per crear el característic doble anell, per la que cada tipus de penicil·lina **es diferenciarà de les altres a través de la cadena lateral acilada**.(3)(4) Les penicil·lines tenen una estructura peculiar, per la que aquesta li atorga una activitat característica contra un grup determinat de bactèries.

A nivell d'estructura química, contenen com a nucli químic, el ja anomenat anell 6-aminopenicilànic (6-APA). Aquest anell està format per un anell  $\beta$ -lactàmic unit a un anell tiazolidínic. Com s'ha comentat amb anterioritat, l'anell  $\beta$ -lactàmic és el responsable de la inhibició de la paret bacteriana, i en canvi l'anell tiazolidínic té la funció de protegir l'anell  $\beta$ -lactàmic. Alhora aquestes es veuen agrupades en una família més gran, les  $\beta$ -lactames.

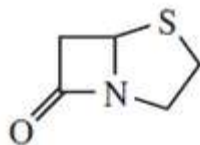


Figura 4: Anell betalactàmic tipus Penicil·lina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

Estructuralment, les penicil·lines a part del nitrògen i sofre de l'anell tiazolidínic i  $\beta$ -lactàmic, presenta les següents agrupacions:

- Un grup carboxil en la posició 2.
- Un radical 2-metil en la posició 3.
- Un grup amino en la posició 6, amb diferents derivats del grup acil ( $R-CO-$ ) com a possibles substituents, que atorga les diverses característiques de les diferents penicil·lines.

La molècula també presenta 3 carbonis asimètrics:

1. El carboni  $C_2$ , que té una configuració absoluta S.
2. Els carbonis  $C_5$  i  $C_6$  que tenen una configuració absoluta R, on cadascun dels seus hidrògens presenta isomeria *cis*.

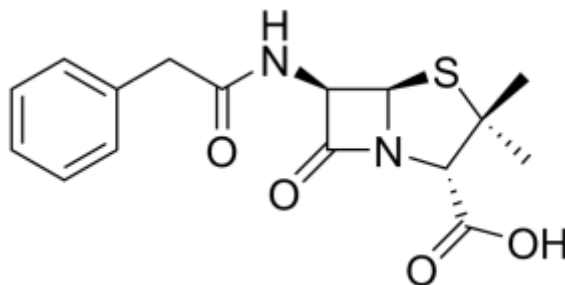


Figura 5: Molècula de Bencilpenicil·lina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

Per altre banda, la producció de les penicil·lines semi sintètiques, provenen de l'**acilació** de la 6-APA.

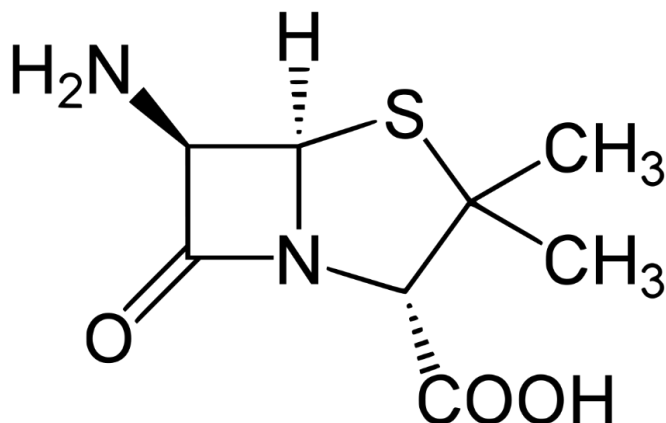


Figura 6: Àcid 6-aminopenicil·lànic (6-APA) , Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

Les  $\beta$ -lactames són afectades per enzims que trenquen l'anell de la molècula, aquests enzims (lactamasas) donen resistència a l'antibiòtic. (5)

Segons la naturalesa sintètica o semi-sintètica de les penicil·lines, es poden classificar en:

### 1. Pencil·lines naturals:

- **Bencilpenicil·lina (penicil·lina G)** "àcid bencilpenicil·lànic ", la bencilpenicil·lina es sintetitza a partir de la fermentació del la família de *Penicillium chrysogenum* , té acció sobre els patògens grampositius. (6)

Es presenta com una antibiòtic en pols microcristal·lina i higroscòpica amb sabor amarg.

Presenta una  $pK_a$  de 2.8, és soluble en: aigua, metanol, etanol, dioxà, DMF, DMSO i poc soluble en: hexà, acetonitril, acetona. És completament insoluble en: toluè, èter, cloroform.

Té una major estabilitat en pH 6.5 i a  $+4^{\circ}C$ . S'inactiva per àcids, hidròxids alcalins i agents oxidants.

També veu reduïda la seva activitat per metalls pesats, etanol, glicerina, iode, àcid làctic i vitamina B<sub>1</sub> i C.

És totalment soluble en aigua, solucions salines i dextroses isotòniques.

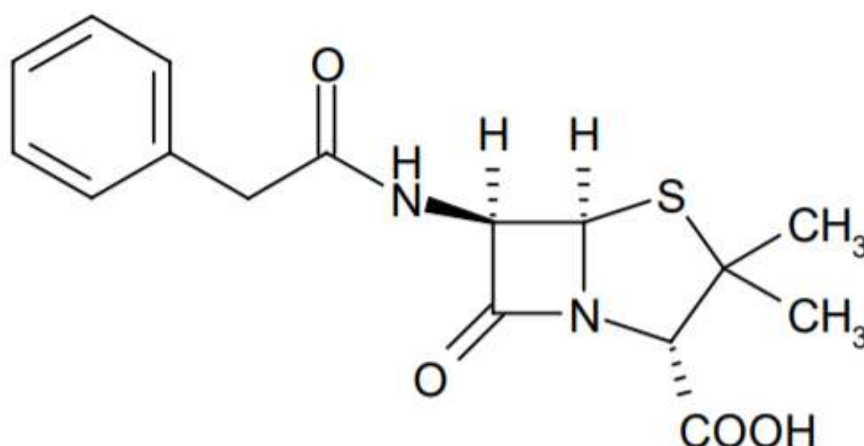


Figura 7: Penicil·lina G, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

## 2. Penicil·lines semisintètiques:

- **Bencilpenicil·lina procaïna:** és una combinació de la penicil·lina G i un anestèsic local (procaïna) de naturalesa del grup dels aminoèsters, pel que es millora la reducció de dolor.

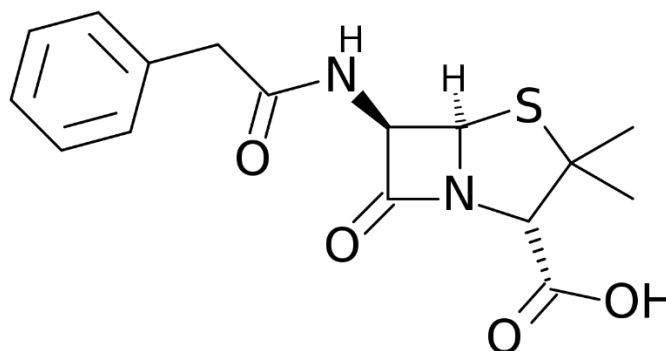


Figura 8: Procaïna bencilpenicilina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org



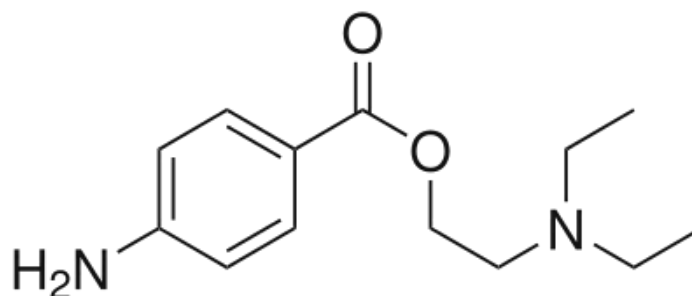


Figura 9: Procaina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

- **Bencilpenicil·lina benzatínica:** resulta de la combinació entre la penicil·lina G i la benzatina.

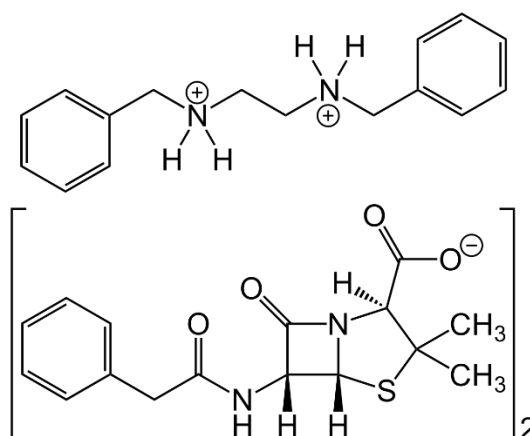


Figura 10: Penicil·lina benzatínica, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

- **Fenoximetilpenicil·lina o penicil·lina V:** “àcid 6-fenoxiacetomidopenicilànic,” es troba en forma àcida i sals monobàsiques (potàssica). Presenta una  $pK_a$  de 2.7  
És soluble en aigua, metanol, DMF, DMSO, és poc soluble en: hexà, acetonitril, acetona. És completament insoluble en: toluè, cloroform.  
És àcido-resistent a  $pH < 5.0$ , i s'inactiva de manera ràpida per medis alcalins ( $pH$  9-11), és estable a  $T < 37^\circ C$ .  
Presenta una  $UV_{m\grave{a}x}$ : 268, 275nm ( $\epsilon$  1330, 1100L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)

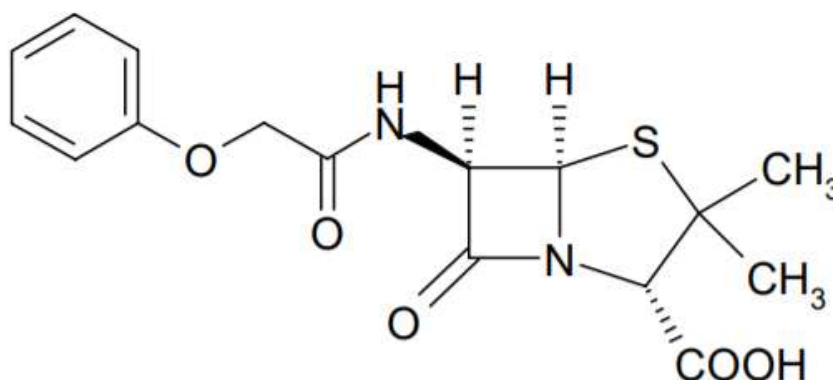


Figura 11: Penicil·lina V, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

- **Resistens a beta-lactamases:** en són exemples a metilcilina, oxacilina, nafcilina, cloxacil·lina i dicloxacil·lina.

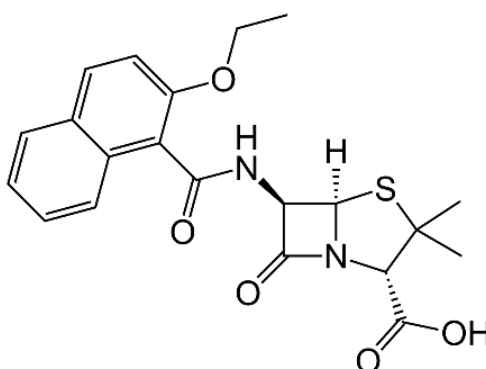


Figura 12: Molècula de Nafcilina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

- **Aminopenicilines:** es tracta de molècules que, sobre una base de bencilpenicil·lina, s'afegeix un grup amino en la posició  $\alpha$  de la cadena lateral, atorgant un alt grau d'estabilitat en medi àcid i augmentant la seva activitat en bacteris gramnegatius.

En formen part d'aquest grup molècules com l'amoxicilina i l'ampicilina. La única diferència entre aquestes dues, és la presència d'un grup hidroxil en la posició *-para* de la cadena lateral del benzè de l'amoxicilina. (7)

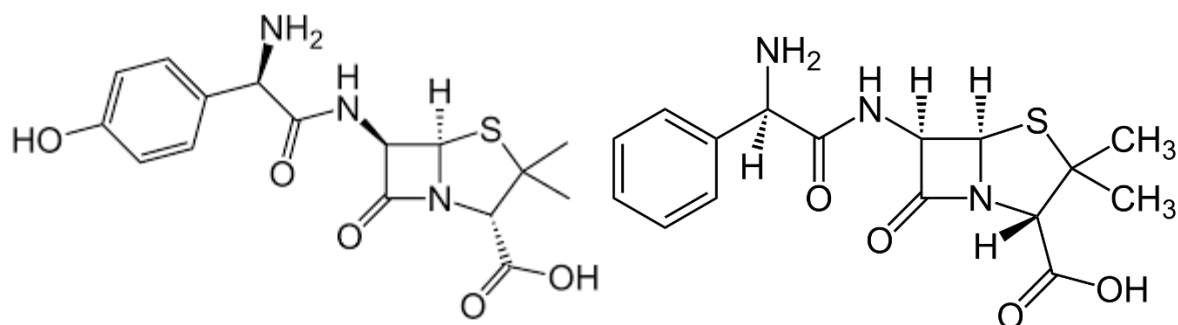


Figura 13: Molècules d'amoxicilina i ampicilina respectivament, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org

### 2.1.2 Acció antimicrobiana dels antibiòtics

A nivell bioquímic, els antibiòtics ataquen a les cèl·lules bacterianes de les següents maneres:

**Antibiòtics  $\beta$ -lactàmics:** inhibeixen la síntesis de les parets cel·lulars bacterianes. L'acció detallada dels antibiòtics de cara als bacteris és la següent:

- Existeix una analogia estructural entre la penicil·lina i el dipèptid D-alanil-D-alanina terminal, associat a les unitats de peptidoglicans que apareixen durant la formació de la paret cel·lular d'algunes bactèries.

El nucleòfil  $O^{(-)}$  serina de la transpeptidasa ataca els grups carbonils dels  $\beta$ -lactàmics degut a la analogia abans comentada amb el dipèptid. Així doncs, s'uneixen covalentment als residus de la serina del lloc actiu de l'enzim en forma de complex peniciloil, així inhibint la transpeptidasa bacteriana. (8)

-

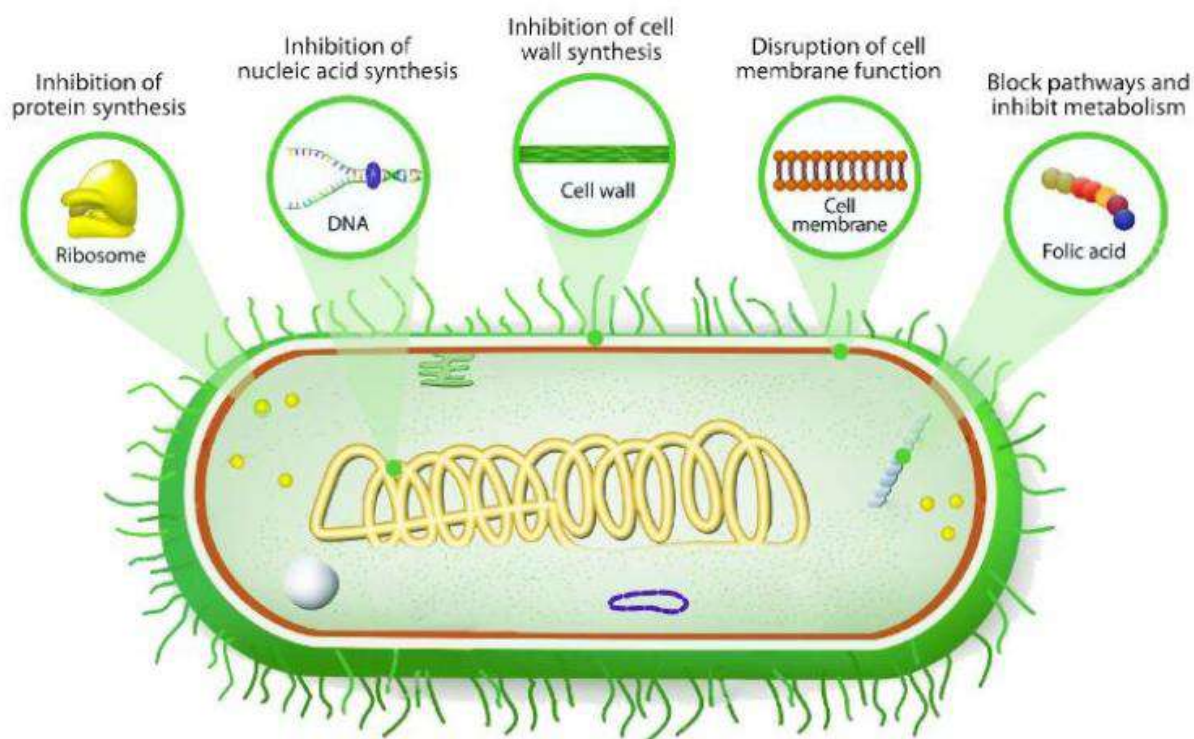


Figura 14: Esquema de l'acció dels antibiòtics sobre un bacteri, Font: Síntesis de antibiòticos- Creative Biolabs Antibody-drug Conjugate (2015)

### 3. Tècniques analítiques

Dels estudis derivats per l'Instituto Mexicano de Tecnologia del Agua exposat en el projecte "Métodos analíticos para determinación de compuestos emergentes en agua" (2015), presentat per Avilés, M; Sánchez, M y Ramírez, N es conclou que un dels mètodes més apropiats per la determinació de penicil·lines i antibiòtics derivats de la penicil·lina, és la cromatografia de líquids amb detector UV-Vis, per la que basant teòrica d'aquest treball de final de grau, anirà encarat a definir aquesta tècnica en concret. Aquesta permet la detecció d'un rang força ampli d'antibiòtics  $\beta$ -lactàmics. També pot resultar molt eficaç la cromatografia de líquids o gasos acoblada a un masses de triple quadrupol. (9) (5) (10) (11) (12)

#### 3.1 Cromatografia líquida amb detector Ultravioleta-Visible (HPLC-UV-VIS)

La cromatografia líquida d'alta eficàcia HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) és utilitzada per la detecció de compostos **insuficientment volàtils, tèrmicament inestables i propensos a descompondre en condicions de separació**, aquest rang de compostos arriba a un 80% dels analits detectats actualment. (5) (13) (14)

L'HPLC és capaç de separar macromolècules i espècies iòniques, productes naturals làbils, materials polimèrics i molècules polifuncionals d'alt pes molecular.

La separació de cromatografia en HPLC és el resultat de les interaccions específiques entre molècules de la mostra amb la fase mòbil i la fase estacionària.

Les fraccions separades es recol·lecten al final de la columna, recollint-ne el contingut en un recipient obert.

El fonament pràctic de la tècnica es basa en acotar adequadament es condicions òptimes d'operació de la columna cromatogràfica. Les variables cromatogràfiques estan relacionades per equacions, però existeixen més variables que equacions, doncs un plantejament analític té diversos graus de llibertat ( $t_M$ ,  $\Delta P$ ,  $N$ ). **És per això que s'intenten reproduir els mètodes operatoris utilitzats en altres experiments de molècules amb una naturalesa similar a la del cas d'aplicació.**

##### 3.1.1 Instrumentació HPLC

L'únic objectiu de la cromatografia per HPLC és d'arribar a un caudal d'eluent raonable per molècules d'entre 2-10  $\mu\text{m}$ , i que aquestes travessin la columna cromatogràfica, per aconseguir-ho es requereix varis centenars de kg-força per  $\text{cm}^2$ .

L'equip necessita de diferents elements que conformin l'estructura del cromatògraf, que són els següents:

### *3.1.1.1 Recipients de fase mòbil i sistemes de tractament de dissolvents*

Tots els HPLC tenen un equip de recipients de vidre o acer inoxidable d'entre 200-1000mL de dissolvent. Solen tenir equips per eliminar gasos dissolts (per evitar les bombolles que provoquen eixamplament de banda i interferències en el detector).

### *3.1.1.2 Sistemes de bombeig*

Pels sistemes d'HPLC el bombeig ha de generar pressions de fins a 6000 psi  $\approx$  408 atm, un flux lliure de pulsacions, un interval de caudals d'entre 0.1 a 10mL/min, el control i reproductibilitat del flux millor del 0,5% relatiu i components resistent a la corrosió.

Degut a que es treballa amb líquids (amb factor de compressibilitat baix), les altes pressions no tenen un risc d'explosió, pel que la ruptura d'un element de l'equip, comportarà una pèrdua de dissolvent o fase mòbil.

Les bombes solen ser de tipus recíproques, pneumàtiques o de pressió constant, bombes de xeringa o desplaçament.

### *3.1.1.3 Sistemes d'injecció de la mostra*

El factor limitant en la precisió de les mesures en cromatografia de líquids, és la reproductibilitat en que s'introdueix la mostra en la columna. Una diferent injecció de la mostra, produeix un eixamplament de les bandes.

S'opta doncs a injectar volums molt petits de mostra d'uns 500 $\mu$ L, sumat a una no-despressurització del sistema mentre s'injecti la mostra.

L'element més utilitzat per fer les injeccions, és la injecció per xeringa a través d'un elastòmer (septum)

### *3.1.1.4 Columnes per cromatografia de líquids*

#### **Columnes analítiques**

Les columnes per cromatografia líquida solen tenir una longitud d'entre 10 i 30 cm, i un diàmetre d'entre 4 i 10 mm, una mida de les partícules dels recobriments d'entre 5 a 10 $\mu$ m. També de manera generalitzada, les columnes solen tenir d'entre 40000 a 60000 plats/metre.

## Precolumnes

Les precolumnes s'utilitzen per allargar la vida útil de la columna, i tenen la funció d'eliminar la matèria en suspensió de la solució a analitzar i els elements que s'uneixen irreversiblement a la fase estacionària.

També serveix per saturar la fase mòbil amb la fase estacionària i minimitzar les pèrdues de la columna.

La precolumna ha d'estar composta d'un material similar a la columna, però amb mides de partícules major per minimitzar la caiguda de pressió. A diferència de la columna, quan la precolumna està obsoleta, es pot buidar i reomplir de nou amb el recobriment.

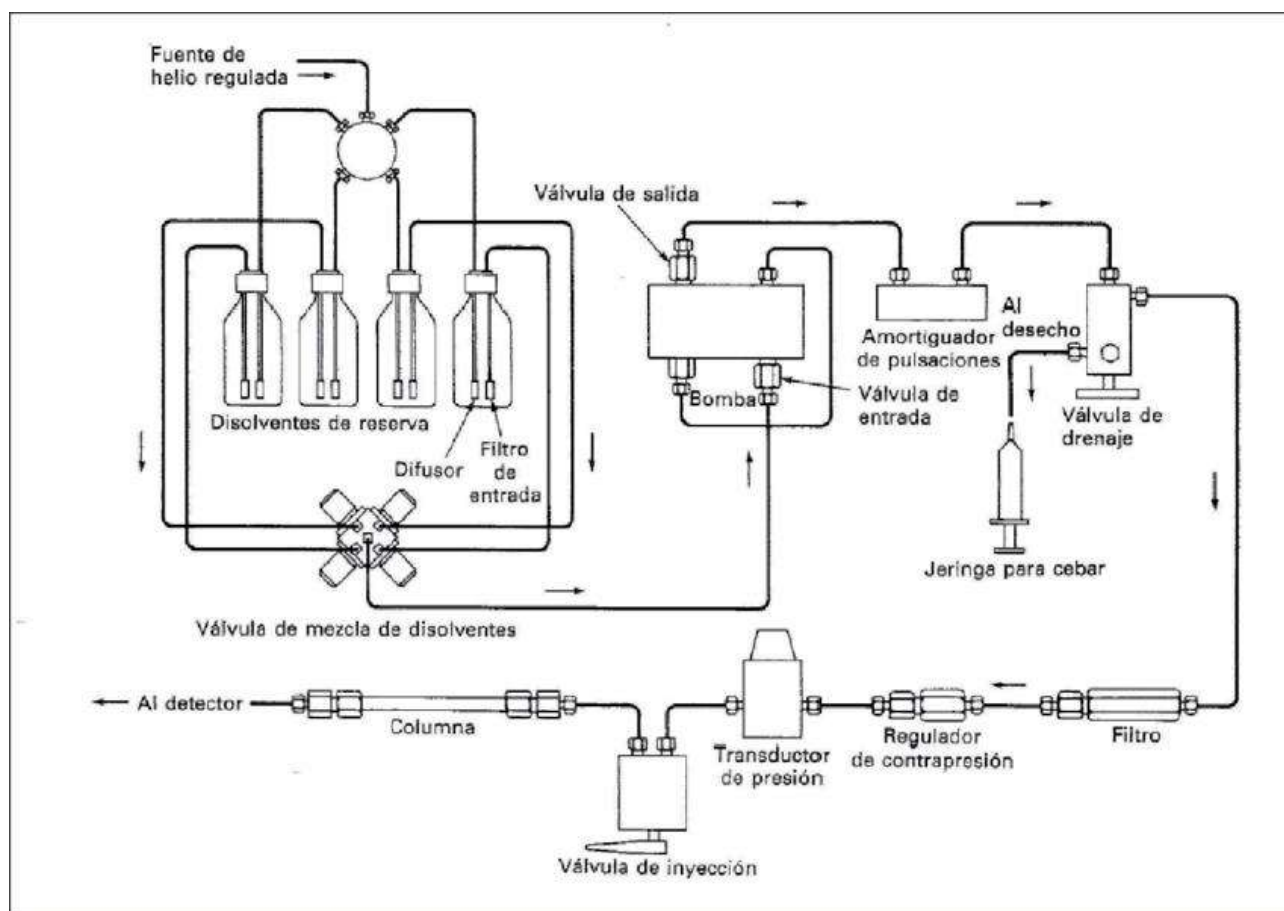


Figura 15: Esquema de funcionament d'un cromatògraf líquid, Font: Departament d'Enginyeria Química Universitat d'Alacant – Cromatografia de líquids d'alta resolució (2019)

### 3.1.1.5 Tipus de recobriments de la columna

Els més utilitzats són els recobriments peculiars i els de partícula porosa.

Els de partícula porosa consisteixen en micropartícules poroses amb diàmetres d'entre 3 i 10 µm amb la menor dispersió possible respecte la mida determinada. Les partícules solen ser de sílice, alumínia, resina sintètica de poliestirè-divinilbenzè o resines d'intercanvi iònic.

Per la sílice, es preparen aglomerant partícules de sílice de mides inferiors al micròmetre per tal que es formin partícules majors molt uniformes. També es pot recobrir la pròpia sílice amb materials orgànics. El tipus de columna del cas experimental és la C<sub>18</sub>.

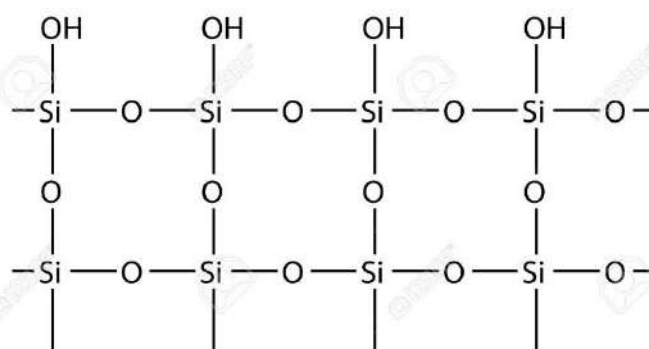


Figura 16: Estructura de la sílice, Font: LEBEDEV, A- 123RF (2021)

### 3.1.1.6 Detectors

#### **Fotòmetres i espectrofotòmetres de Ultravioleta-visible (Detector UV-Vis)**

El detector ideal per instrumentació cromatogràfica, hauria de ser un detector: adequat a la sensibilitat, bona estabilitat i reproductibilitat, resposta lineal per tots els soluts que s'estenguin a varis ordres de magnitud, rang de T° de treball d'entre 20°C a 400°C, temps de resposta curt independentment del caudal, alta fiabilitat, resposta semblant en tots els soluts i no destructiu per la mostra.

En el cas d'aplicació, s'utilitza un DAD, pel que la llum d'una làmpada de deuteri es dirigeix a través d'una reixeta a una reixeta de difracció, que difon la llum blanca en diverses longituds d'ona.

La reixeta es posiciona en un angle concret de manera de dirigir la porció desitjada de l'espectre, on el flux de llum desitjat es dirigirà a través de la cel·la cap al fotodíode. A mesura que la mostra passa a través de la cel·la de flux, la quantitat de llum transmesa al fotodíode disminueix (ja que



l'absorbeix l'analit), aquesta diferència en transmitància es converteix en la sortida del detector en unitats d'absorbància. (15)

Els detectors òptics basats en l'absorció d' Ultraviolat-Visible (UV-Vis) formen el 70% del total de detectors utilitzats en HPLC.

De manera genèrica es coneixen 3 tipus de detectors: detector de longitud d'ona fixa, detector de longitud d'ona variable i detector d'escombrat de longitud d'ona (en temps real).

L'espectrofotometria UV-visible és una tècnica analítica que permet determinar la concentració d'un compost en solució. Es fonamenta en que les molècules absorbeixen les radiacions electromagnètiques en longituds d'ona concrets, i alhora la quantitat de llum absorbida depèn de manera lineal a la concentració de l'analit.

La majoria de molècules tenen capacitat per absorbir radiacions (cadascuna en la fracció de l'espectre corresponent), pel que absorbirà a un espectre o a un altre depenent de l'estructura atòmica i les condicions del medi (pH, temperatura, força iònica, constant dielèctrica). (16)

La longitud d'ona UV es defineix en el rang de longituds d'ona d'entre 195-400nm.

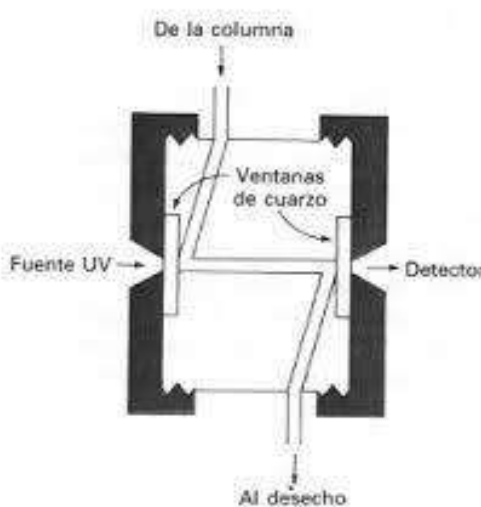


Figura 17: Cel·la del detector UV en HPLC, Font: Departament d'Enginyeria Química Universitat d'Alacant – Cromatografia de líquids d'alta resolució (2019)

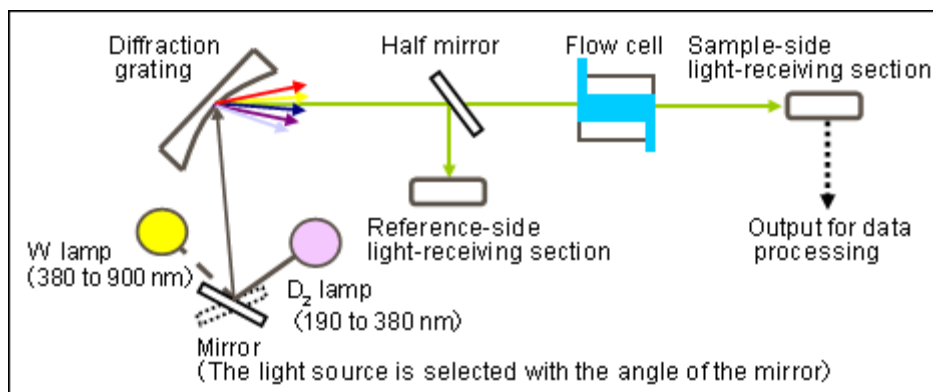


Figura 18: Diagrama d'un detector UV-Vis, Font: Detectores UV/UV-Vis- HITACHI Inspire the next (2021)

La majoria d'HPLC tenen detectors que consisteixen en un espectrofotòmetre d'escombrat amb una xarxa entre els seus components òptics.

### Detectors de díodes

Té els mateixos components que un detector de longitud d'ona variable però estan configurats de diferent manera.

S'utilitza una làmpada de deuteri, però la llum blanca es dirigeix directament a la cel·la de flux abans d'arribar a la cel·la de difracció. Una vegada la llum incideix a la reixeta de difracció, arriba a la matriu lineal de fotodíodes.

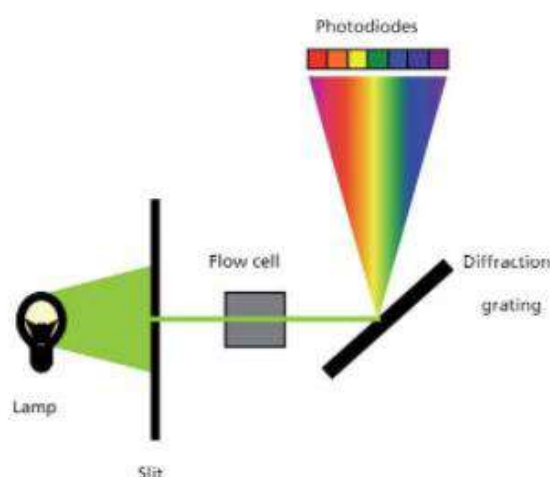


Figura 19: Esquema d'un detector de díodes, Font: DOLAN, J – Detectores Ultravioleta- Solutions for separation scientists (2016)

## 4. Fongs

Per definició de la Real Acadèmia Espanyola, els fongs són “plantas talofitas, sense clorofil·la, de mida variada i reproducció preferentment asexual, per espores”. Solen ser paràsits, o bé viuen sobre matèries orgàniques en descomposició. Contenen talos, normalment ramificats i filamentosos (conegut com micelis), pel que absorbeix els principals principis orgànics nutritius que existeixen en el medi”. **Actualment, un 20% dels antibiòtics provenen de fongs filamentosos.**

L'alimentació dels fongs és osmotròfica (per la que els nutrients són absorbits de substàncies dissoltes), mentre que la digestió és externa i s'agrega enzims. De manera generalitzada, els fongs són organismes eucariòtics, heteròtrofs i pluricel·lulars (en excepció dels llevats). Obtenen els nutrients per absorció, per la que secreten enzims digestius al medi, i després aquests són absorbits de nou.

### 4.1 Estructura dels fongs

Els fongs del cas d'estudi compten amb una massa de filaments molt ramificats (hifes). Les membranes cel·lulars de la majoria de fongs són poroses i permeten un flux citoplasmàtic d'una cèl·lula a una altra.

En altres grups de fongs, els nuclis estan dispersos en una massa citoplasmàtica ininterrompuda: són estructures cenocítiques. La massa filamentosa completa s'anomena miceli.

Morfològicament les cèl·lules són allargades, varien en longitud i tenen un diàmetre de 3 a 15µm. Les parets cel·lulars estan formades per quitina.

Quan un fong filamentós es desenvolupa, una porció d'aquest s'encarrega de l'absorció de nutrients (miceli vegetatiu), i la zona que està projectada cap a l'exterior s'encarrega de la reproducció.

### 4.2 Cicle de vida dels fongs

Depenent de la família de fongs, els cicles de vida poden canviar lleugerament, però per les famílies de fongs que es tracten en el treball, (*Rhizopus stolonifer* i *Penicillium*), la reproducció és sexual, per la que dues hifes especialitzades de dues soques d'aparellament diferents entren en contacte i es fusionen. (16) (17)

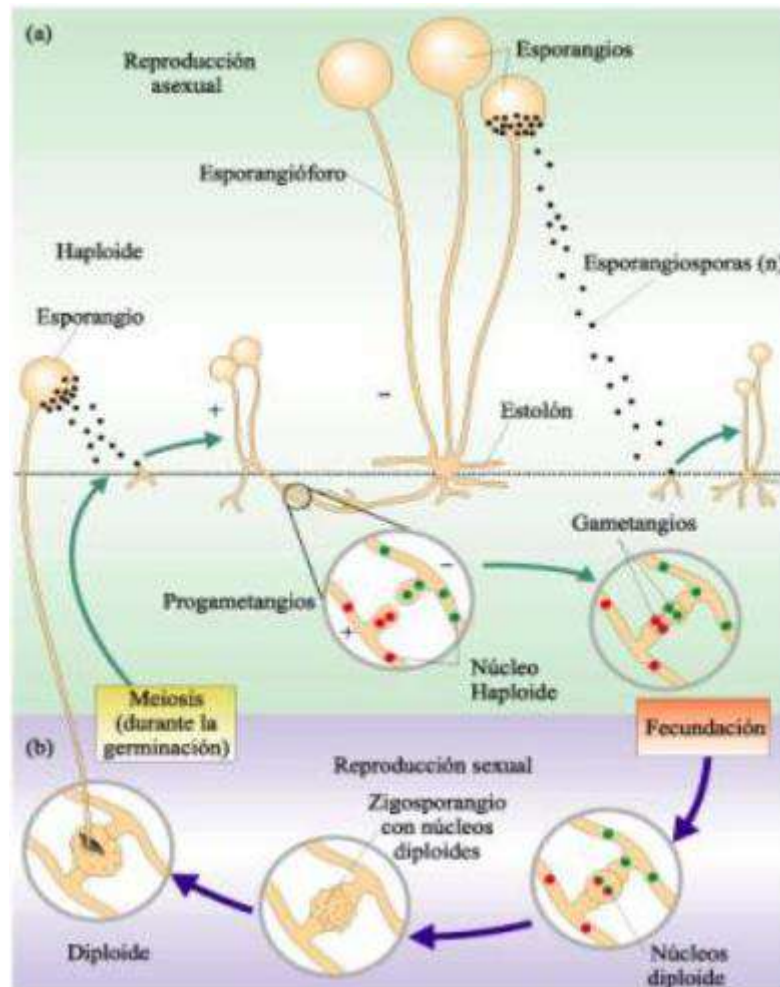


Figura 20: Cicle vital dels fongs, Font: GONZÁLEZ, C- Ciclo de vida- Hongos (2005)

Durant llarga part del cicle de vida, l'organisme és haploide (haploide: cèl·lula que conté un sol joc de cromosomes o la meitat del número de cromosomes de cèl·lules diploides). L'organisme es presenta amb diverses hifes, que serviran per fixar l'organisme i absorbir els nutrients. Es poden reproduir de manera sexual o asexual. La reproducció asexual es produeix per fragmentació.

### **Creixement i nutrició**

Els fongs són quimioheteròtrofs, pel que absorbeixen els seus propis nutrients, no són organismes fotosintètics.

Els fongs filamentosos, tenen capacitat de creixement en zones d'humitat baixa, pressions osmòtiques elevades i nivells de pH baix. Són susceptibles a créixer en ambients on hi hagi presència d'àcid ascòrbic, sorbat de potassi i benzoat de sodi.

### 4.3 Fongs en el cas experimental

De manera espontània, amb les condicions ambientals adequades, s'observa que en qualsevol tipus de pa o aliments fructífers hi ha creixement de fongs.

De manera generalitzada, per diferents tipus de pa, els fongs amb més protagonisme dintre de les matrius, són de les famílies: ***Penicillium*** i ***Rhizopus stolonifer***, per la que es coneix que poden derivar a la síntesis d'antibiòtics.

Per altre banda, en aliments fructífers, té més protagonisme la família de ***Penicillium***. Pels fongs en el cas d'estudi, és de més interès definir-ne el ***Penicillium Chrysogenum***:

#### ***Penicillium Chrysogenum***

##### **Característiques**

És un fong filamentós hialí, sapròfit (capaç de descompondre matèria orgànica per produir compostos de carboni simples per alimentar-se) i pertanyent a la branca dels Ascomycets. Es caracteritzen per tenir un creixement ràpid. Conté hifes septades, que li dona una aparença avellutada i color verd-blavós.

L'espècie és ubiqua (pot créixer en qualsevol part), i es sol trobar en indrets tancats associats a plantes.

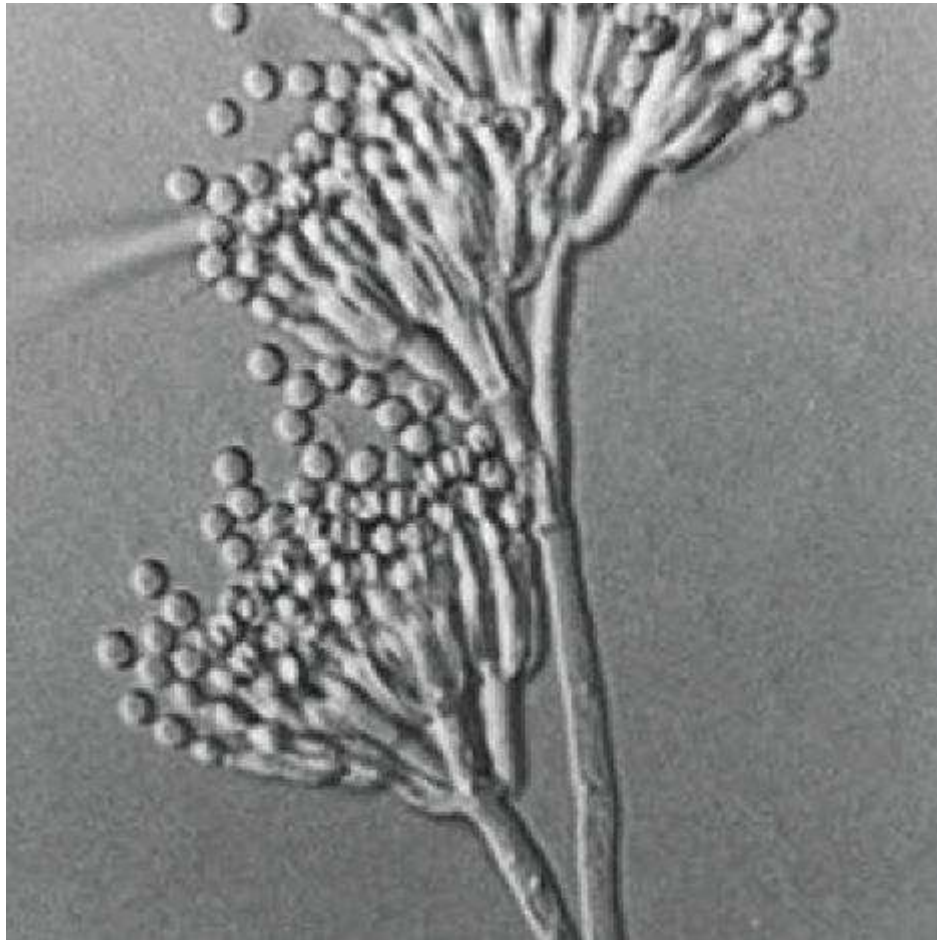


Figura 21: Imatge de *Penicillium Chrysogenum* inoculat en un cultiu a través microscopi electrònic, Font: MARIJKE, AH – Research Gate (2006)

Té una reproducció asexual mitjançant conidies (espores asexuals) que produeixen en els conidiòfors. En canvi la reproducció sexuals, es produeix en ascòs (cossos fructífers).

### **Producció de metabòlits secundaris**

És de molt interès pel projecte, conèixer quin tipus de metabòlits secundaris produeix la família *Penicillium*.

Els metabòlits secundaris són els compostos orgànics produïts per éssers vius que no intervenen en el metabolisme, en aquest cas els metabòlits produïts són roquefortina C, meleagrina i **Penicil·lina**.

També se'n destaquen les xantoxilinas, que són les causants del color groc del exssuat típic de l'espècie *Penicillium*. També poden produir les aflatoxines, que són microtoxines nocives per l'ésser humà.

### **Nutrició**

L'espècie és sapròfita, i la descomposició dels compostos per la posterior absorció de les hifes es fa a través de glicògen. (18) (19)

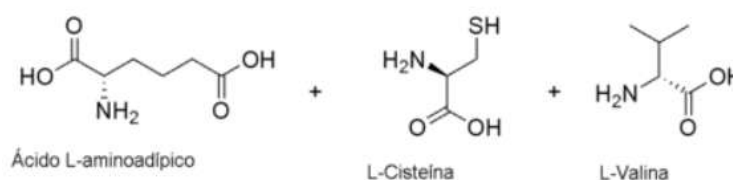
***Es poden consultar les diverses imatges realitzades a través del microscopi electrònic de les poblacions de fongs del cas experimental, adjuntades a l'apartat d' Annex I: Observacions a través del microscopi electrònic.***

#### 4.4 Biosíntesis teòrica de la Penicil·lina per *Penicillium chrysogenum*

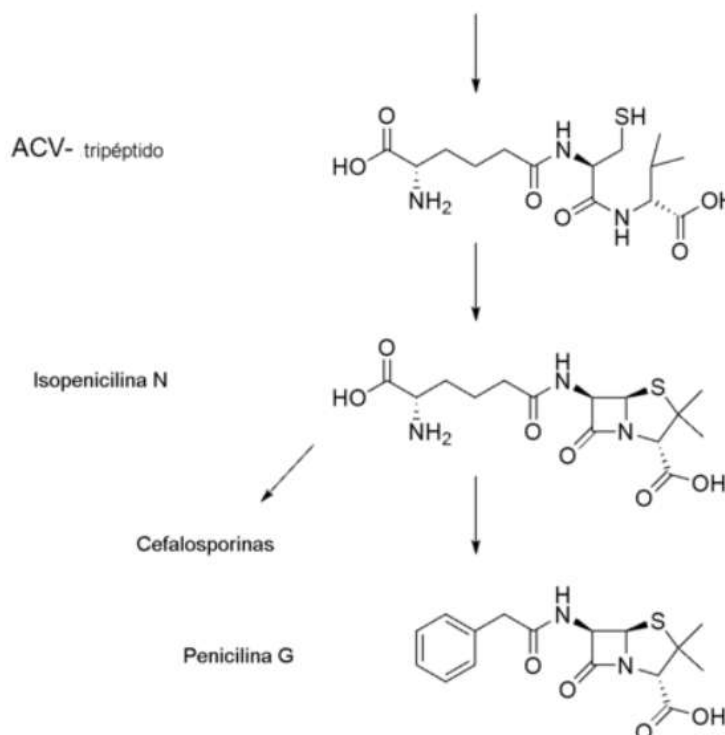
El punt d'unió entre els primers apartats del projecte, es veu reflexat en aquesta biosíntesis:

La biosíntesis de la penicil·lina consta de 3 etapes diferenciades:

1. Unió seqüencial dels AA L- $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteïna i L-valina per formar el tripèptid lineal  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV).



2. Ciclació del tripèptid ACV, procés originat per la molècula isopenicilina N. Aquesta ciclació és una reacció oxidativa per la que es produeix una pèrdua de quatre àtoms d'hidrogen per cada molècula de tripèptid. Els productes d'aquesta reacció, són dos anells característics de les penicil·lines: anell  $\beta$ -lactàmic i l'anell tiozolidínic.



La reacció està catalitzada per l'enzim isopenicilina N sintasa (o ciclasa).

3. Intercanvi de la cadena lateral de la isopenicilina N (àcid  $\alpha$ -aminoadípico) per l'àcid fenilacètic. (20)

Figura 22: Ruta de biosíntesis de la Penicil·lina, Font: Galeria d'imatges .eswikipedia.org



## 5 Part experimental

### 5.1 Introducció a la part experimental

El recorregut de la part experimental del treball, consisteix resumidament en assegurar el creixement de diverses població de fongs (pel que bibliogràficament es coneix que és propensa a sintetitzar antibiòtics com a metabòlits secundaris del seu cicle de vida) en un medi preparat per acollir a la població (PDA).

La soca de la població de fongs en aquest cas, s'extraurà de substrats inicials molt comuns: el pa, taronja, llimona i mandarina.

En condicions d'humitat i temperatura idonis, la font d'hidrats de carboni proporcionada pels substrats, funcionarà com una font de nutrients pels possibles fongs que puguin estar acomodats en l'ambient en que es trobi el substrat.

Així doncs, la part inicial del tram experimental del treball, constarà en aplicar les condicions d'humitat i temperatura en els substrats idonis pel creixement espontani de fongs.

Una vegada s'observin poblacions de fongs, es procedirà a inocular les poblacions, i fer-les reproduir en plaques de petri, per tal de tenir una mostra inicial significativa, i poder tenir més reproductibilitat per poder fer més anàlisis en la part posterior que apliqui la instrumentació analítica.

La darrera part experimental, consta de preparar les solucions extracció que permetin dissoldre els antibiòtics i fer-ne la detecció d'aquests a través de tècniques analítiques idònies.

La nomenclatura per les diferents mostres de les següents poblacions és:

R21-22: Cultiu de pa artesanal

R23-24: Cultiu de taronja

R25-26: Cultiu de mandarina

R27-28: Cultiu de llimona

R29-30: Cultiu de pa artesanal (secció de les parts de tonalitats negres)

## 5.2 Creixement

A partir dels substrats proposats per l'obtenció de poblacions de fongs, i en les condicions d'humitat i temperatura idònies pel creixement d'aquests, en les matrius alimentàries es van observar creixements espontanis de poblacions de fongs, que posteriorment es van inocular en diferents plaques petri, comentades en el següent apartat.

## 5.3 Reproducció

Quan s'observa un creixement de la població de fongs en el substrat, s'aïlla la soca cap a un medi estèril i més propens perquè la població pugui tenir un creixement major.

Pel cas d'aplicació, el medi escollit ha sigut el medi agar papa dextrosa (PDA), amb la següent composició:

- 4g/L d'extracte de patata
- 20g/L de dextrosa
- 15g/L agar-agar

Per la que s'estima un pH final de  $5,5 \pm 0,2$ , pel que se'n farà un seguiment del creixement corresponent en les plaques petri.

El creixement dintre de les plaques petri es duu a terme a dintre d'una estufa aïllada tèrmicament de marca P/SELECTA amb calibratge i manteniment per l'empresa Almirall Prodesfarma. Les condicions de creixement són de 24-26°C durant un període estimat de 50 dies.

El resultat final del desenvolupament de les diferents poblacions es pot observar en les següents fotografies:



*Figura 23: Cultiu mostra R21-22 en etapa inicial, Font: Elaboració pròpia*



*Figura 24: Cultiu mostra R21-22, Font: Elaboració pròpia*



*Figura 25: Cultiu mostra R23-24 en etapa inicial, Font: Elaboració pròpia*



*Figura 26: Cultiu mostra R23-24, Font: Elaboració pròpia*



*Figura 27: Cultiu mostra R25-26, Font: Elaboració pròpia*



*Figura 28: Cultiu mostra R27-28 en etapa inicial, Font: Elaboració pròpia*



*Figura 29: Cultiu de la mostra R27-28, Font: Elaboració pròpia*

## 5.4 Mètode operatiu de caracterització d'antibiòtics

Una vegada es compta amb la població de fongs suficient per fer-ne les extraccions, es procedeix a duu a terme el mètode operatiu.

Es coneix que la cromatografia líquida amb detector UV-visible és eficaç per la detecció de compostos antibiòtics com ara: oxacilina, cloracilina, dicloxacil·lina, penicil·lina V, penicil·lina G, Nafcilina, Sulfadiazina, Amoxicilina, etc...

La decisió final d'elecció de la tècnica analítica recau en que els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics són molècules poc volàtils, poc termoestables i es podrien degradar si s'utilitzés la cromatografia en fase gas i l'espectre de masses.

Pel cas del projecte s'escull la cromatografia líquida i detector UV-visible perquè es considera una tècnica menys evasiva pel compost a analitzar. La robustesa que ofereix l'HPLC no es veu reflexada per igual en el cromatògraf de gasos acoblat a masses. L'alt pes molecular de la majoria d'antibiòtics també reafirma la utilització de la cromatografia líquida.



## **Especificacions tècniques i de metodologia**

Pel cas d'estudi, s'utilitzarà un cromatògraf de líquids d'alta resolució (HPLC) model Waters 2695 Alliance 2 Separations Module amb detector UV-Vis (DAD) Diode Array Detector.



*Figura 30: Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC) model Waters 2695 Alliance 2 Separations Module amb detector UV-Vis (DAD) Diode Array Detector, Font: Elaboració pròpia*

Les condicions i variables experimentals que s'utilitzen en el cromatògraf són les següents:

**Condicions de l'HPLC-DAD en isocràtic-  
Columna Kinetex per la detecció de Penicil·lina  
G**

<b>Cromatògraf</b>	HPLC Waters 2695 Alliance 2
<b>Detector</b>	Ultraviolat-Visible (DAD- Diode Array Detector)
<b>Columna</b>	Kinetex EVO C <sub>18</sub> , 15cm x 4.6 mm I.D., 5µm particles (H19 - 366051) - Phenomenex
<b>Fase mòbil</b>	Fase A: Aigua-buffer acetat amònic (10mM) pH= 4.5 àcid acètic  Fase B: Acetonitril (75:25, A:B)
<b>Flux de treball</b>	1mL min <sup>-1</sup>
<b>Volum injecció</b>	10 µL
<b>Temperatura de columna</b>	35°C
<b>Longitud d'ona</b>	220nm

*Taula 1: Condicions cromatogràfiques pel cas d'estudi*



El mètode operatori es resumeix en fer una extracció manual de la població microbiana (preferiblement masses pròximes a 1g).

L'extracció per compostos com Penicilina V, Penicilina G, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nfacillin i Amoxicilina i en aquest cas penicil·lina G es fa a partir de la solució extracció (que coincideix amb la fase mòbil) de 10mM de acetat d'amoni ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) regulat a pH pròxim a 4.7 (en el cas pràctic exactament pH=4.505) amb àcid acètic, pel que suposadament els compostos  $\beta$ -lactàmics han patir un traspàs de la fase sòlida del cultiu, cap a la fase líquida.

Per les mostres experimentals de les mostres R21 fins la R30 es fixa un volum de medi d'extracció de 10mL d'acetat d'amoni, on es farà l'extracció en un recipient de Brand de 50mL.

Una vegada la mostra està dintre del recipient de Brand, per tal d'afavorir aquesta extracció dels compostos antibiòtics, s'utilitza un bany d'ultrasons, amb una durada de 15min i una temperatura aproximada de 25°C.

Aquesta solució posteriorment es filtra a través de la xeringa de filtració amb l'ajuda de filtres de Nylon de la marca Clarify Syringe Filters, amb una amplitud de filtració de 45 $\mu\text{m}$  i diàmetre de 13mm i la solució és introduïda en un vial de 2mL de capacitat, pel que es pot fer la injecció en l'HPLC-DAD directament.

Com a metodologia recurrent, qualsevol dels líquids que s'hagin d'introduir a la columna cromatogràfica (ja siguin fase mòbil, solució de mostra o d'altres), han de ser filtrats amb una bomba de buit i embut Kitasatos, a través d'un paper de filtre de 45 $\mu\text{m}$ .

El fet d'utilitzar una solució salina com a fase mòbil (sal d'acetat d'amoni), comporta haver de fer pre-rentats a la columna cromatogràfica, per evitar possibles saturacions d'aquesta.

Per tal de poder executar el mètode analític, s'ha intentat reproduir un mètode operatori proporcionat per Sigma-Aldrich, pel que observant els resultats experimentals de detecció de Pencillin G Procaine Salt Monohydrate i AFMP (com a patró intern), per HPLC en una columna Ascentis C<sub>18</sub>, ens serveix per intuir que el pic d'interès a detectar sortirà entre el minut 2 i 5.

En els dos casos (tant el proporcionat per Sigma-Aldrich com en el del cas experimental), es considera fer un mètode isocràtic (durant la separació s'utilitza sempre el mateix solvent), degut a la poca durada que tenen els mètodes, doncs no cal fer un gradient de solvent per disminuir el temps de detecció.

***Per més informació sobre el mètode especificat , dirigir-se a l'apartat d'Annex III.I: Condicions d'assaig per la detecció de Penicillin G Procaine Salt Monohydrate (Sigma-Aldrich)***

## 5.5 Resultats experimentals

El plantejament experimental ha sigut d'adquirir un patró de penicil·lina G per tal de poder confirmar la presència d'antibiòtics i la concentració dintre dels diferents cultius de fongs, ja que tenint un resultat teòric-experimental del patró, es podrà reflexar la similitud (o no) amb les mostres resultants de l'extracció.

Després de manera reproducible es torna a fer la injecció amb les mostres extretes de les plaques de petri, per la que es suposa que s'han d'observar resultats similars als de la injecció del patró de PenG.

### 5.5.1 Cromatograma i espectres UV

#### 5.5.1.1 Patró de Penicil·lina G

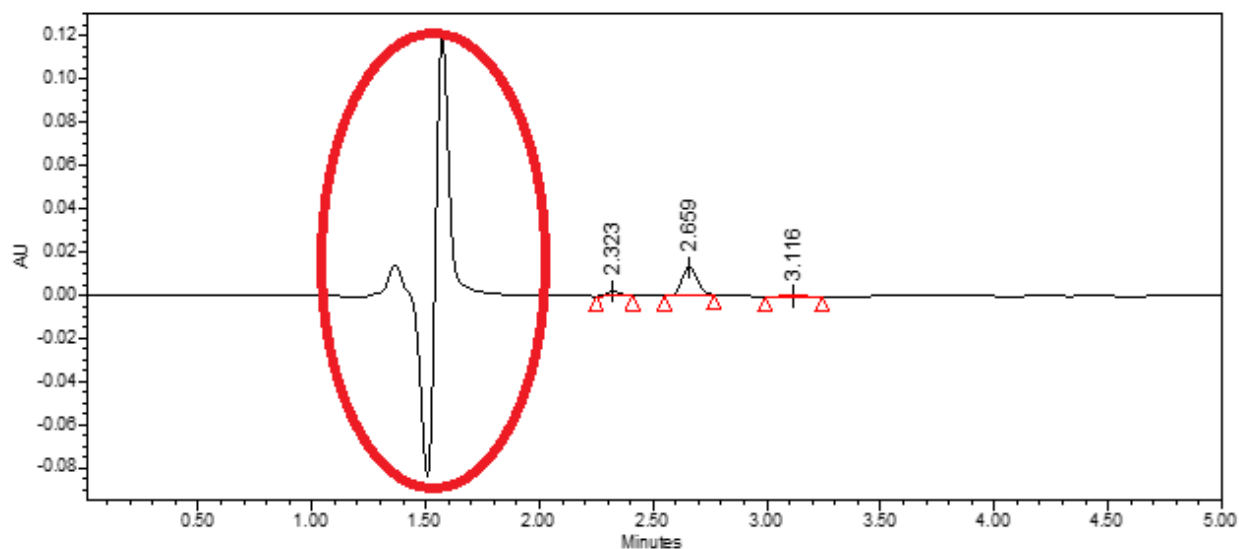
El patró de PenG que s'ha utilitzat és de Bencilpenicil·lina Procaïna (Procaine Benzylpenicillin CRS) d'una puresa de 99.99% de la Comercial Merk, i amb referència de la European Pharmacopeia Reference, amb el codi P3090000 en una quantitat de 250mg, i una massa molecular de 588.72 g mol<sup>-1</sup>. La composició química del compost en qüestió és d'un 96,8% de C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S (Penicilina G) i un 40.1% de C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Procaïna).

***Per més informació analítica addicional del patró, dirigir-se a l'apartat d'Annex II: Fitxa tècnica patró Penicillin G Procaine Salt Monohydrate (Sigma-Aldrich)***

Del patró de PenG se'n prepara un solució inicial de 100 µg/mL (o de manera equivalent 1000ppm), i les seves alíquotes corresponents de 0ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm.

D'aquests diferents resultats n'obtidrem varies àrees dels pics cromatogràfics en funció de la concentració que s'hagi injectat, i se'n podrà fer una recta de calibratge que ens servirà per detectar i quantificar la concentració dels analits.

Els resultats en el cromatograma i en l'espectre UV-Visible de les injeccions de patró de PenG són els següents:



*Figura 31: Exemple del cromatograma esperat del patró de PenG, Font: Elaboració pròpia*

\*És visible i diferenciat en tots els cromatogrames aquest pic base (marcat en color vermell). Aquest no és indicador de la presència d'antibiòtics, sinó que només és un pic degut a la interacció de la fase mòbil amb el tipus de columna utilitzada.

Del cromatograma se'n visualitza un pic a 2.6min i una banda d'absorció en la longitud d'ona de 200nm característica de la PenG, pel que si s'obté un pic en aquesta zona, es pot afirmar que es tracta de la Penicil·lina G.

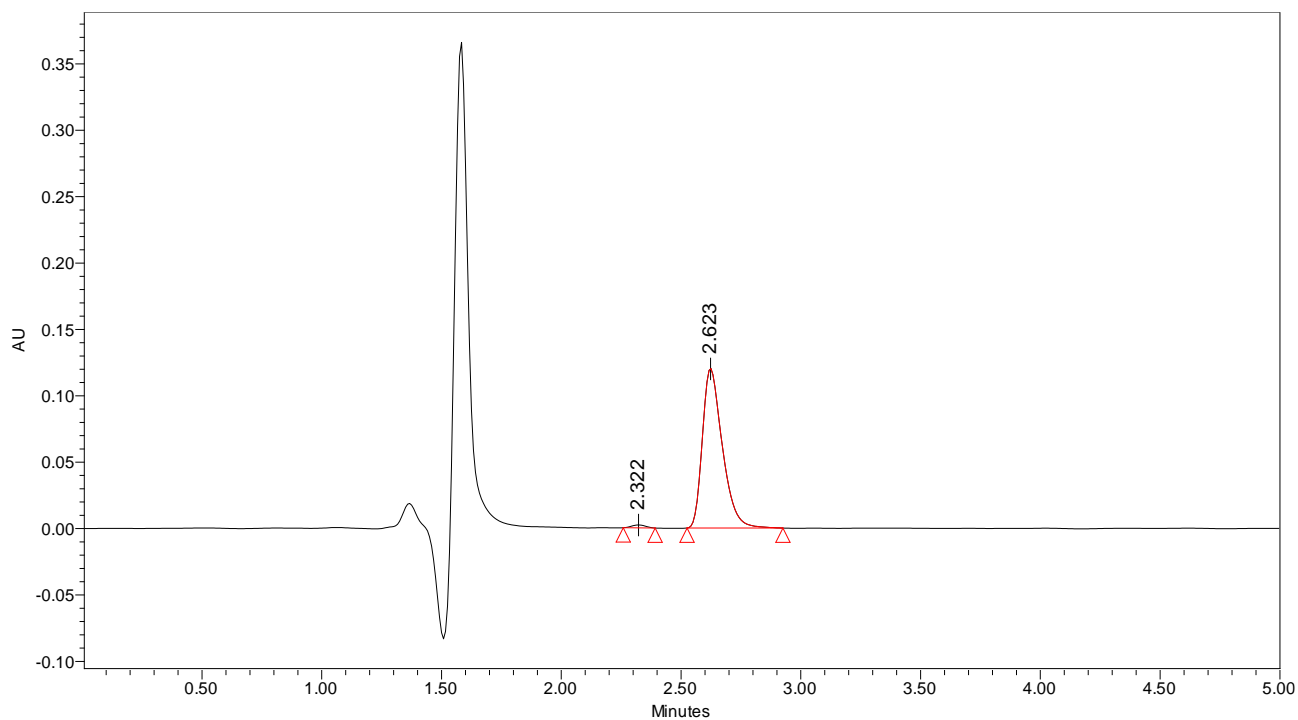


Figura 32: Cromatograma Bencilpenicilina Procaina 10mg/L, Font: Elaboració pròpia

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.322159262	8624.58	1.22
2		2.623	696700.96	98.77

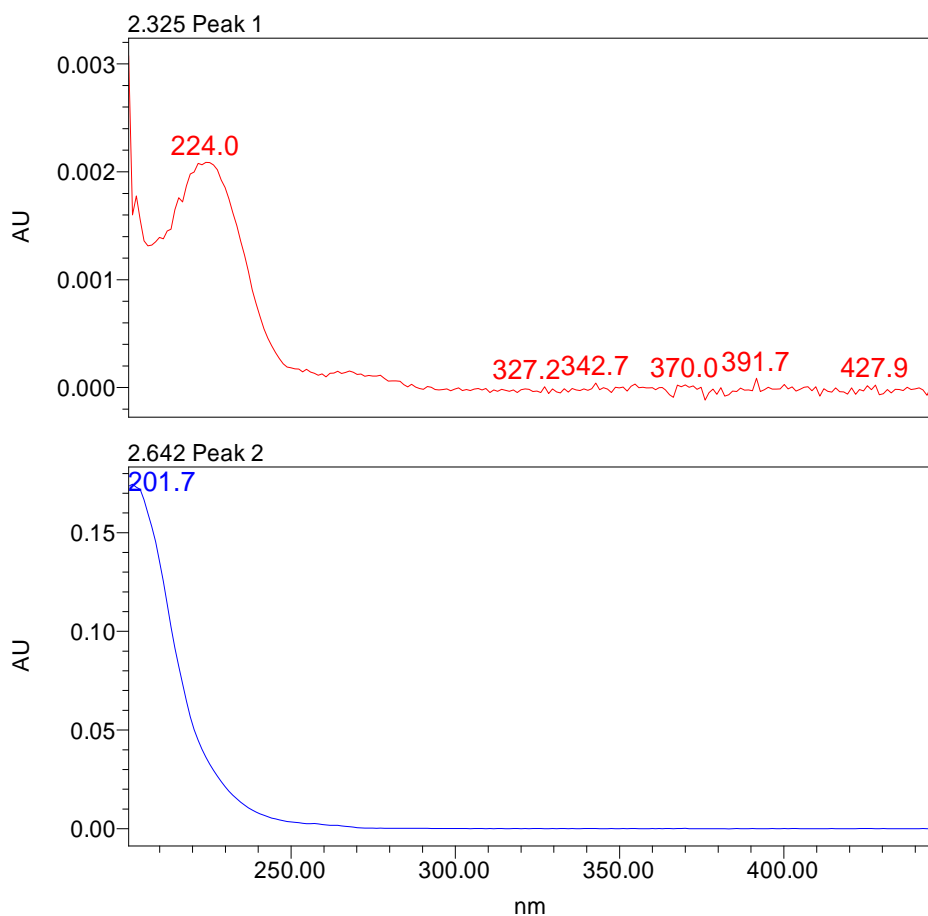


Figura 33: Espectre UV-Visible Bencilpenicilina Procaïna 10mg/L, Font: Elaboració pròpia

Per la resta d'alíquotes del patró s'obtenen cromatogrames i espectres UV pràcticament idèntics (amb cert desplaçament dels pics), però amb un notable canvi d'integració d'àrees, pel que indica que les diferents concentracions afecten l'àrea dels pics.

#### 5.5.1.1.1 Recta de calibratge del patró de PenG

Els resultats necessaris per fer la recta de calibratge de les diferents alíquotes són els següents:

Concentració teòrica (ppm)	Concentració real (ppm)	Àrea pic	Retention time
0	0	0	0
1	0.967	61856.9	2.659
2	1.934	109460.9	2.662
5	4.835	268441.021	2.645

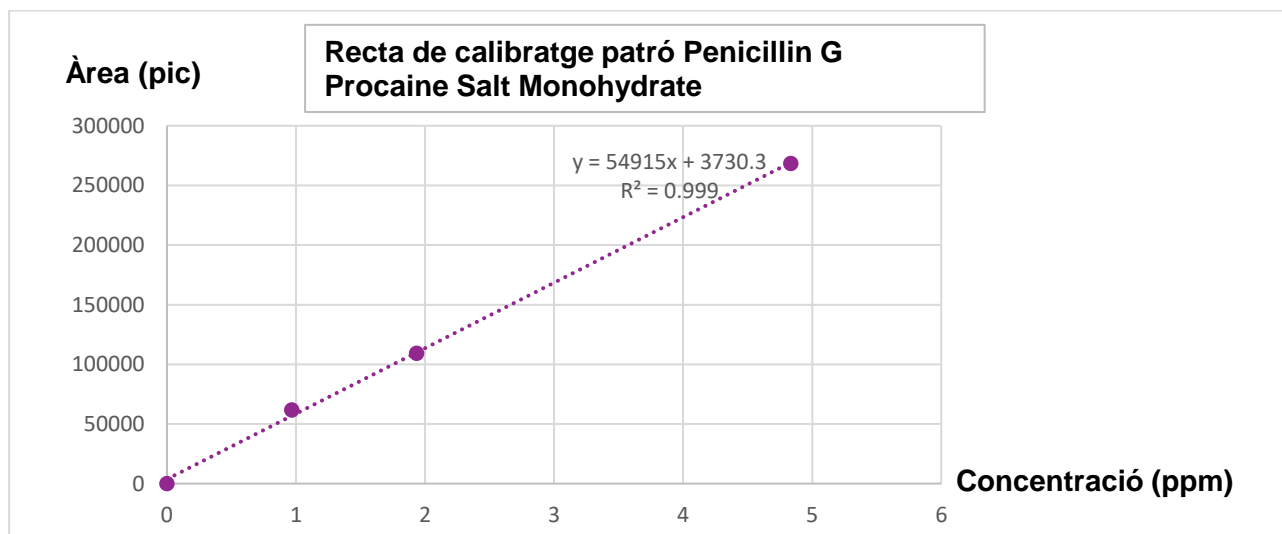


Figura 34: Gràfica de la recta de calibratge del patró de PenG, Font: Elaboració pròpia

Amb les diferents injeccions de patró, s'observa una relació lineal pel que es pot formular la següent recta:

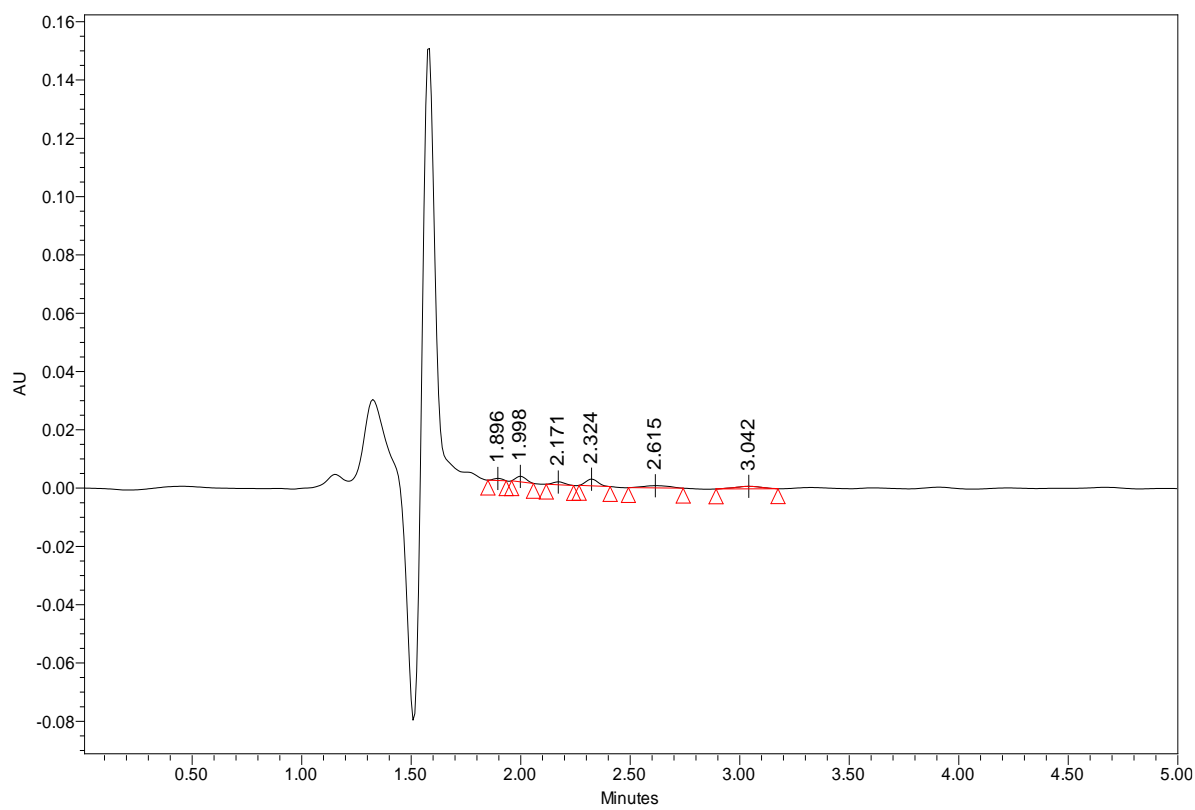
$$\text{Àrea pic} = 54915 \cdot \text{Concentració (ppm)} + 3730.3$$

#### 5.5.1.2 Resultats de les mostres experimentals

En aquest apartat es pot visualitzar el resultat d'una de les mostres experimentals de les poblacions de fongs (que pot donar una idea de la resta de resultats).

Per totes les mostres, s'adjunta el cromatograma, amb la taula-resum de la informació necessària a conèixer dels pics, i el seu espectre UV corresponent.

Pel que s'observen més pics però amb menys àrea que en els patrons de PenG. És exemple la mostra R30, per la que totes les mostres experimentals presentaran cromatogrames més confusos que el del propi patró, degut a la diversitat de poblacions de fongs que es visualitzaven en les plaques petri.



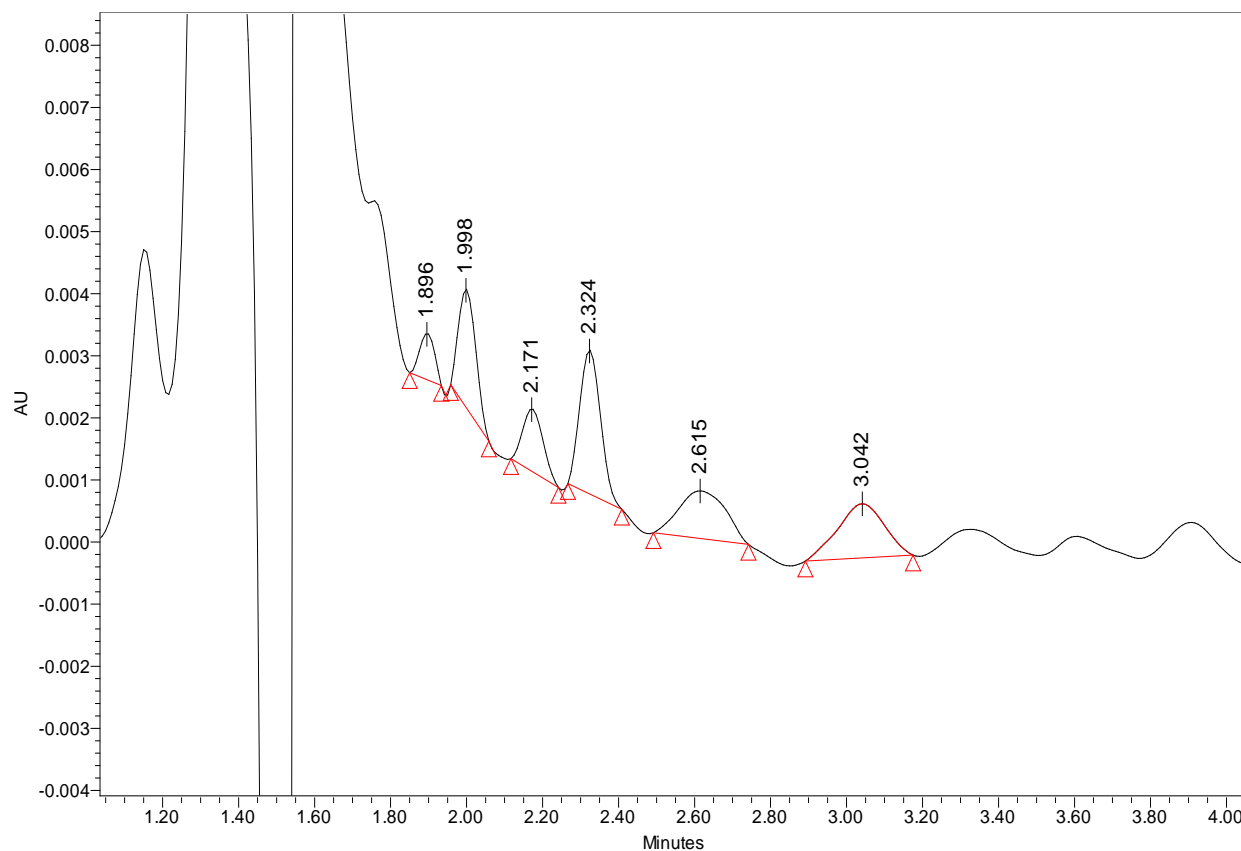


Figura 35: Cromatograma mostra R30, Font: Elaboració pròpia

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.895	2025.62	5.85
2		1.993	6035.14	17.43
3		2.171	3745.17	10.82
4		2.323	8805.067	25.44
5	Penicilin G	2.614	6545.84	18.91
6		3.041	7453.96	21.53



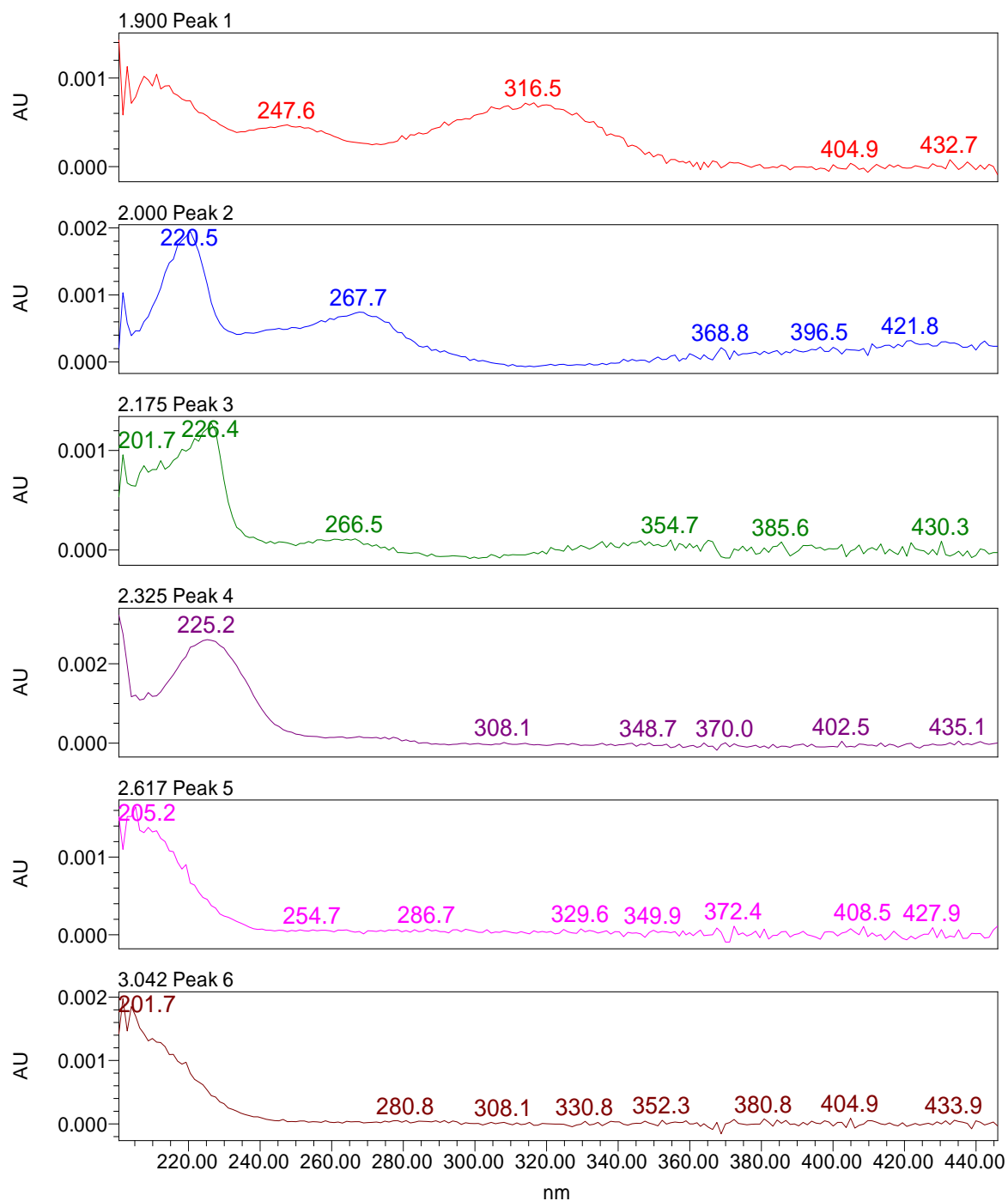


Figura 36: Espectre UV-Visible R30, Font: Elaboració pròpia

Una vegada es compta amb la recta de calibratge, es poden interpretar els resultats obtinguts de les mostres experimentals. On pels pics amb temps de retenció pròxims a 2.6 min es suposa una detecció positiva d'antibiòtics.

Els resultats per cada mostra es veuen resumits en la següent **Taula 2**:

Mostra	Name	Retention Time	Area	% Area	Presència antibiòtics
R21	Penicillin G	2.621	4922.50	19.50	Positiva (*)
R22	Indefinit	2.789	6204.85	26.38	Negativa
R23	Penicillin G	2.597	1601.11	7.229	Positiva (*)
R24	Penicillin G	2.600	2259.76	8.324	Positiva (*)
R25	Indefinit	2.326	6988.32	28.82	Negativa
R26	Indefinit	2.325	13620.28	41.69	Negativa
R27	Indefinit	2.324	9741.69	82.41	Negativa
R28	Penicillin G	2.601	570.100	2.366	Positiva (*)
R29	Indefinit	2.790	4299.63	13.75	Negativa
R30	Penicillin G	2.614	6545.84	18.91	Positiva (*)

*Taula 2: Taula-resum dels resultats analítics de la mostra R21-R30*

(\*) La presència positiva es fonamenta en que el pic presenti un temps de retenció de 2.6 min, i que l'espectre UV correspongui amb el del patró

**Per consultar els cromatogrames i espectres Ultraviolats de totes les mostres, dirigir-se en l'apartat d'Annex IV: Resultats experimentals: cromatogrames i espectres UV**

## 5.6 Concentracions i ràtios de síntesis d'antibiòtics

De la recta de calibratge obtinguda en els apartats anteriors, es poden calcular les diferents concentracions d'antibiòtic en cada mostra, si se'n aïlla la concentració de l'equació de la recta, i s'introdueix l'àrea obtinguda en cada cas:

$$\text{Concentració (ppm)} = \frac{\text{Àrea} - 3730.3}{54915}$$

Coneixent el volum de 10mL de fase mòbil pel que estaven continguts els possibles antibiòtics, es poden calcular els grams d'antibiòtic totals de cada mostra, a més a més, si se'n coneix els grams d'antibiòtic produïts, i es coneix la massa de fongs que composaven la mostra, es pot extreure el rendiment de síntesis d'antibiòtics que presenta cadascuna de les poblacions escollides.

Mostra	Àrea antibiòtic	Concentració antibiòtic (ppm)	Pes mostra (g)	Pes antibiòtic (mg) / pes cultiu (kg) *
R21	4922.502	0.0217	0.9557	0.22705
R23	1601.115	<0.02	1.0235	-
R24	2259.761	<0.02	1.1051	-
R28	570.1001	<0.02	0.9927	-
R30	6545.848	0.0512	0.916	0.5589

Taula 3: Taula resum dels càlculs analítics de les mostres de detecció positiva

(\*) El paràmetre de pes cultiu (kg) no fa referència explícita a només cultiu de fongs, degut a la impossibilitat de poder aïllar el cultiu de fongs de manera diferenciada

La impossibilitat de quantificar la concentració de les mostres R23, R24 i R28 es deu a les limitacions que presenta la recta de calibratge, on l'ordenada a l'origen té un valor de 3730.3 per la que fa donar valors negatius de concentració. També es pot deure a valors de concentració de la recta de



calibratge (0 ppm, 1 ppm, 2 ppm i 5ppm) massa elevats respecte a les concentracions reals que s'està treballant. L'acotació de la recta de calibratge per valors més baixos de concentració no ha sigut possible de dur a terme degut a la ràpida degradació del patró de Penicillin G per la que ja estava obsolet en poques setmanes.

## Conclusions

Els resultats obtinguts a través de l'HPLC-DAD evidencien la presència d'antibiòtics en els diferents cultius de fongs. D'aquests resultats es pot concloure que els fongs són una espècie potencial a sintetitzar antibiòtics, però de la mateixa manera també es pot afirmar que concretament en el cas d'estudi s'han detectat en quantitats molt reduïdes.

Es conclou que la tècnica d'HPLC-DAD ha sigut eficaç per la detecció, però també seria d'interès utilitzar algun mètode analític que combini la cromatografia líquida amb un detector de masses acoblat. El fet de no poder controlar la diversitat de les poblacions, ni les possibles interferències que tindrien en els resultats, ha derivat a obtenir cromatogrames i espectres UV de difícil interpretació, per la que es visualitzen forces pics, i se'n pot concloure que potser es tracta de compostos  $\beta$ -lactàmics de pròxima afinitat amb la Penicil·lina, es sospita que a partir de l'espectrometria de masses es podria arribar a distingir de quin tipus de molècules es tracten.

El mètode operatori de la columna cromatogràfica ha sigut útil per assolir els objectius del treball, però si es fes un estudi concret per validar un mètode concret per la detecció de la Penicil·lina G, els resultats podrien ser més precisos i distingibles.

Dels resultats analítics, en podem concloure que el cultiu amb més capacitat de síntesis d'antibiòtics és la del cultiu R30 amb un rendiment de síntesis de 0.5589 mg PenG /kg cultiu.

Per altre banda, les poblacions R28 ha tingut un rendiment de síntesis molt baix, per la que s'ha obtingut una àrea de 570.10u<sup>2</sup>.

Una baixa síntesi d'antibiòtics, per tant, una baixa concentració d'aquests en les mostres, ha derivat que els instruments analítics, tot i tenir un rang de detecció molt ampli, tinguessin dificultats per obtenir espectres ultraviolats-visibles amb una definició completament clara, tot i així, tenint en compte la novetat del mètode, els resultats són molt positius pel projecte. Els baixos rendiments de síntesis d'antibiòtics s'atribueixen a que les quantitats amb les que es treballava de fongs eren molt baixes, però a més a més, de tot el conjunt de fongs, els que eren potencials productors d'antibiòtics, no eren la majoria. Seria de molt interès doncs, poder determinar per un estudi microbiològic, quants dels nostres cultius de fongs eren realment propensos a sintetitzar els compostos  $\beta$ -lactàmics.

Es conclou la presència positiva d'antibiòtics en les poblacions R21, R23, R24, R28, R30. També se'n destaca, que igualment per les mostres que han tingut una detecció positiva o negativa, tenen com a punt d'unió entre tots els cromatogrames pics notablement visibles en un temps de retenció de 2.3min. S'ha detectat una obtenció de resultats molt variada, per la que mostres poden tenir múltiples pics, i d'altres en presenten dos. Aquests resultats poden induir a confusions, doncs poden sortir % Àrea poc coherents, però específicament pel cas d'aplicació resulta de molt més utilitat fixar-se només en el temps de retenció.

Els resultats de presència positiva de  $\beta$ -lactàmics en les poblacions R21, R23-24 (corresponents a poblacions de pa i taronja) concorden amb els resultats esperats, i reforcen els resultats obtinguts en les fotografies microscòpiques, on poblacions filamentoses i de tonalitats verdes (aparentment corresponent a *Penicillium*) han donat resultats positius. Destacar-ne la població R30 amb més percentatge de síntesis d'antibiòtic, que se'n deriva de la població de fongs amb tonalitats negres provinent del pa. Aquestes deteccions positives es fonamenten en un temps de retenció pròxim al 2.6 min detectat pel patró de PenG i pels resultats obtinguts en els espectres Ultravioleta, pel que s'observa un pic d'absorbància en una longitud d'ona de 200-205 nm. S'ha observat que degut a la poca alçada dels pics obtinguts en els cromatogrames, algun dels espectres UV estan poc definits, se'n pot distingir el pic d'absorbància, però es podrien acotar més els resultats.

El plantejament d'aquest treball, com a projecte de camp i experimental, ha comportat certes complicacions, com ara: no possibilitat de determinar amb afirmació científica el conjunt de tipus de poblacions espontànies de fongs que han crescut en les plaques petri. L'obtenció de resultats analítics positius, però en mesures reduïdes, és a dir, no es podia saber de manera exacte, quin seria el rendiment de les diferents poblacions. Referent a la síntesis d'antibiòtics, potser si s'haguessin treballat amb volums molt més grans de fongs, la síntesis hagués sigut més notable.

Un altre factor a tenir en compte, és la casi impossibilitat d'obtenir patrons de Penicil·lina G pura, ja que no existeix cap antibiòtic que estigui compostat únicament per Penicil·lina G (les propietats que té farmacèuticament no són suficients per subministrar-se als pacients), on bibliogràficament només es troben models, procediments i resultats per antibiòtics semisintètics (Bencilpenicil·lina Procaïna, Penicil·lina Benzatínica, Penicil·lina V, Penicil·lina X, etc...), això ha comportat que els patrons utilitzats s'aproximin molt al que interessava pel projecte, però no es pot afirmar al 100%, (però si en molt alta probabilitat), que la detecció ha sigut exactament de Penicil·lina G, tot i que podem afirmar que es tracta de compostos  $\beta$ -lactàmics. Relacionat amb aquest aspecte, i una vegada fet la anàlisi, s'entén que amb un patró de Penicil·lina G pura, els resultats podrien haver sigut més ajustats, tot i així, el cost econòmic que significava la compra d'aquests tipus de patrons era massa elevat.

La ràpida degradació que patia el patró de Penicil·lina G, tot i estar emmagatzemat en condicions d'entre 3-5°C, ha dificultat la reproductibilitat dels diferents anàlisis. Aquesta observació, reforça l'elecció de la tècnica d'HPLC en comptes de la CG, ja que es sospitava que la poca estabilitat respecte les variacions de temperatura dels antibiòtics, podia derivar a la destrucció de l'analit en cas que s'hagués utilitzat la CG com a mètode analític. És per això que les injeccions no s'han pogut repetir, ja que la mostra de fongs era limitada i a degradació ràpida de l'analit conduïa a que no es poguessin repetir les injeccions al cap d'uns dies, és per això que si es repetís l'analítica, es proposaria d'intentar concentrar més les mostres: o bé es podria utilitzar una SPE més eficaç per retenir més partícules que no siguin d'interès, o bé es podria augmentar la quantitat de mostra per menys volum de fase mòbil. En el moment de preparar la recta de calibratge, no s'ha tingut en compte aquest factor de degradació i ha dificultat la quantificació total de totes les mostres que han tingut un resultat positiu en presència d'antibiòtics. En qüestió de dues setmanes, per un patró de

mateixa concentració, es va passar a tenir un àrea de 696700.96 u<sup>2</sup> a només 38652.1599, pel que només representa un 5.54% de l'àrea en front la mostra injectada amb una anterioritat de dues setmanes.

El fet de repetir les rectes de calibratge per tal d'obtenir R<sup>2</sup> el més pròximes a 1 possibles, pot servir, com en aquest cas, a teòricament poder intuir en quin rang de concentració ha d'estar la recta de calibratge, tot i que degut a la qüestió comentada anteriorment, no s'ha pogut acotar la recta en els rangs desitjats.

Com a efecte anecdòtic, durant el creixement dels diferents fongs en les plaques petri, en 3 de les 4 poblacions, es visualitzava una espècie de metabòlit de color groc distribuït per la placa, per referències bibliogràfiques, es pot associar aquest color a les xantoxilinas.

Del plantejament inicial del treball, se'n destaca gran capacitat antifúngica dels conservants dels pans industrials, ja que en un període de 5 mesos, no han aparegut fongs visibles en la superfície del pa.

Com a conclusió final del treball, es vol destacar l'experiència d'haver d'innovar i modificar les analítiques i càlculs quan es treballa amb treballs experimentals de camp, i que un error sempre serveix per avançar, doncs descartar una opció que no ha sortit bé ja és un avenç. I que s'entén quela química analítica potser no és la part més visible de l'enginyeria química, on tots els processos estan controlats i optimitzats, però la branca de recerca és una part primària i necessària per sostenir la indústria química.

## Seguiment de la part experimental

Una vegada s'han fet els diferents casos d'estudi per la detecció d'antibiòtics, i amb resultats positius per l'HPLC-UV-Vis, es considera que l'estudi podria seguir per la detecció d'un rang més gran d'espectre d'antibiòtics, per la que es podria aconseguir un perfil més acurat de la família de fongs que han aparegut espontàniament en les plaques de petri.

Es pot proposar de preparar altres patrons de diferents antibiòtics, que se'n pugui detectar la presència a partir d'observacions microscòpiques caracteritzant el tipus de població.

De la mateixa manera, també es pot optimitzar el mètode exposat en aquest treball, i fer-ne un estudi de diferents concentracions de solució extracció, treballar amb diferents temperatures, la possibilitat de canviar-ne la columna, etc... per tal d'obtenir pics en el cromatograma més esvelts i més remarcats.

Seria d'interès, investigar si l'espectroscòpia de masses és una tècnica interessant a utilitzar en aquest treball, ja que és una de les dues tècniques que es plantejava per executar l'anàlisi.

S'entén que la continuïtat d'aquest projecte, passa per la vesant més biotecnològica, l'estudi microbiològic i finalment les aplicacions en enginyeria química. De les soques de fongs inicials, i en el cas més idealitzat, es podria intentar fer una producció industrial, fer-ne un estudi de rendiments de reacció, i intentar obtenir Penicil·lina G a nivell industrial.



## Bibliografia i webgrafia

- (1) MORÁN, A- “Antibióticos” - DCiencia Ciencia para todos- Consultat al 23 de febrer de 2021. Web disponible a: <https://www.dciencia.es/antibioticos/>
- (2) LÓPEZ GALLEGO, C- “Desarrollo de antibióticos a lo largo del siglo XX: Resistencias y estrategias” - Universidad Complutense, Facultad de Farmacia. Consultat al 25 de febrer de 2021. Web disponible a: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CARMEN%20LOPEZ%20GALLEGO.pdf>
- (3) J.E GARCÍA SÁNCHEZ; R. LÓPEZ; J.PRIETO - “Antimicrobianos en medicina”- Departament de Microbiologia, Facultad de Medicina Universidad de Salamanca, Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas , Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid –Sociedad Española de Quimioterapia - Prous Science S.A (1999)
- (4) SUÁREZ, C; GUDIOL, F- “Antibióticos betalactámicos”- Enfermedades Infecciosas y microbiologia clínica- ELSEVIER- Consultat al 23 de febrer de 2021. Web disponible a: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-antibioticos-betalactamicos-S0213005X08000323>
- (5) BENITO PEÑA,M.E- “Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en muestras de interés agroalimentario y mediambiental” - Universidad Complutense de Madrid. Consultat al 20 de febrer de 2021. Web disponible a: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/7422/1/T29424.pdf>
- (6) MÁXIMA UTRIATRE, J- “Penicilina”- Características-co - Consultat al 23 de febrer de 2021. Web disponible a: <https://www.caracteristicas.co/penicilina/>
- (7) TORRES, J.B- “Clonación, expresión y caracterización de las penicilina acilasas de *Streptomyces lavendulae* y *Actinoplanes uthahensis*”. Consultat al 23 de febrer de 2021. Web disponible a: <ile:///C:/Users/adamg/Downloads/Tesis Jesus Torres Bacete UCM.pdf>
- (8) “Síntesis de antibióticos”- Creative Biolabs, Antibody-drug Conjugate. Consultat al 15 de febrer de 2021. Web disponible a: <https://www.creative-biolabs.com/adc/antibiotic-synthesis.htm>
- (9) HOBART H. WILLARD; LYNNE L. MERRIT, JR; FRANK A. SETTLE, JR- “Métodos instrumentales de análisis”- University of Michigan, Indiana University, University of Tennessee at Knoxville, Virginia Military Institute- Grupo Editorial Iberoamérica (1991).

- (10) SÁNCHEZ, M; AVILÉS, M ; GONZÁLEZ, L.A; RAMÍREZ, N- *Proyecto: "Identificación de compuestos orgánicos emergentes: desarrollo e implementación de metodologías para análisis por cromatografía de líquidos o gases"*. Consultat al 29 de febrer de 2021. Web disponible a: <http://repositorio.imta.mx/bitstream/handle/20.500.12013/1411/TC-1102.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (11) TALERO-PÉREZ, Y.V; MEDINA, O.J; ROZO-NÚÑEZ, W- *"Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloramfenicol"*. Consultat al 29 de febrer de 2021. Web disponible a: <http://www.scielo.org.co/pdf/unsc/v19n1/v19n1a01.pdf>
- (12) LA ROSA ZAMBRANO, P; ESPINOZA, J.A; CONTE-JUNIOR, C.A; LÁZARO DE LA TORRE, C.A – *"Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida"*. Consultat a l'1 de març de 2021. Web disponible a: <file:///C:/Users/adamg/Downloads/970-Texto%20do%20artigo-5632-3-10-20191009.pdf>
- (13) DOUGLAS A. SKOOG; F. JAMES HOLLER, TIMOTHY A. NIEMAN- *"Principios de Análisis instrumental"* - (Quinta Edición) Stanford University, University of Kentucky, University of Illinois en Urbana-Champaign - Editorial McGraw Hill (2001)
- (14) AVILÉS, M; SÁNCHEZ, M; RAMÍREZ, N - *Proyecto: "métodos analíticos para determinación de compuestos emergentes en agua"* – Instituto Mexicano de tecnología del agua. Consultat al 24 de febrer de 2021. Web disponible a: <http://repositorio.imta.mx/bitstream/handle/20.500.12013/1778/TC-1502.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (15) MIZELL, J- *"Cromatografía"*- Metrics contract services. Consultat al d'abril de 2021. Consultat al 20 de març de 2021. Web disponible a: <https://www.metricscontractservices.com/resource/diode-array-detection-used-to-identify-peaks-in-chromatography/>
- (16) DOLAN, W.J- *"Detectores Ultravioleta"* - LCGC -Solutions for separation scientists. Consultat al 13 de juny de 2021. Web disponible a: <https://www.chromatographyonline.com/view/how-does-it-work-part-iv-ultraviolet-detectors>
- (17) GONZÁLEZ, C- *"Ciclos de vida-Hongos"* - Consultat al 28 de febrer de 2021. Web disponible a: <https://botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/Ciclo-Vida/Hongos.htm>
- (18) GÓMEZ, V- *"Penicillium chrysogenum: características, morfología, hábitat"* - Lifeder. Consultat al 15 de març de 2021. Web disponible a: <https://www.lifeder.com/penicillium-chrysogenum/>
- (19) *"Penicillium spp"* - DATABIO- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Consultat al 10 de març de 2021. Web disponible a:



<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>

(20) RUIZ, A; LAIZ, E- "*Biosíntesis de pencilina por Penicillium chrysogenum. Regulación por la Fuente de carbono*" - DC. Consultat al 25 de març de 2021. Web disponible a: [http://digital.csic.es/handle/10261/64260#:~:text=La%20ruta%20de%20bios%C3%ADntesis%20de.D-valina%20\(ACV\).](http://digital.csic.es/handle/10261/64260#:~:text=La%20ruta%20de%20bios%C3%ADntesis%20de.D-valina%20(ACV).)

## Annexes

### Annex I: Observacions a través del microscopi electrònic

#### Annex I.I Observacions microscòpiques població R21-22



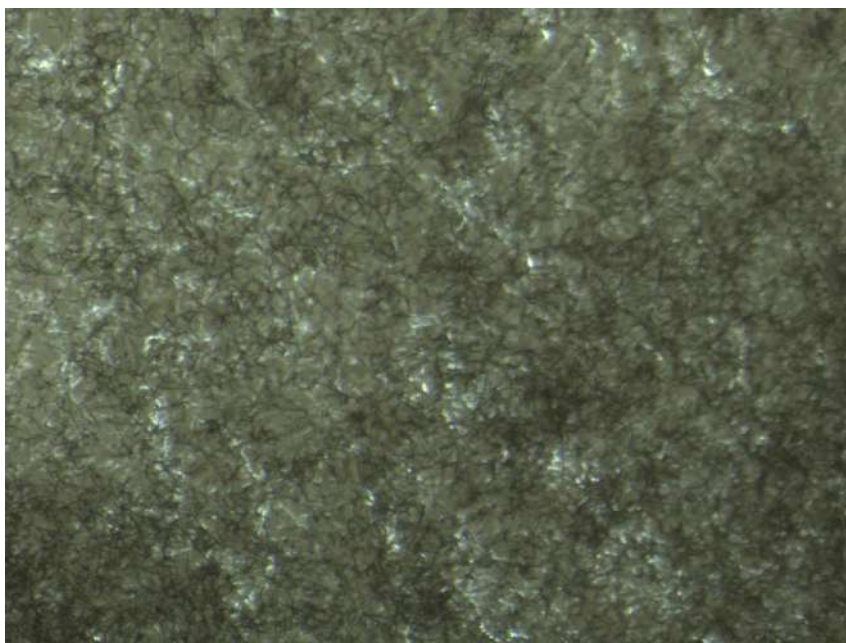
*Figura 37: Observació mostra R21-22 ( N<sup>o</sup> augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia*



*Figura 38: Observació mostra R21-22 ( N<sup>o</sup> augments 10 x 5), Font: Elaboració pròpia*

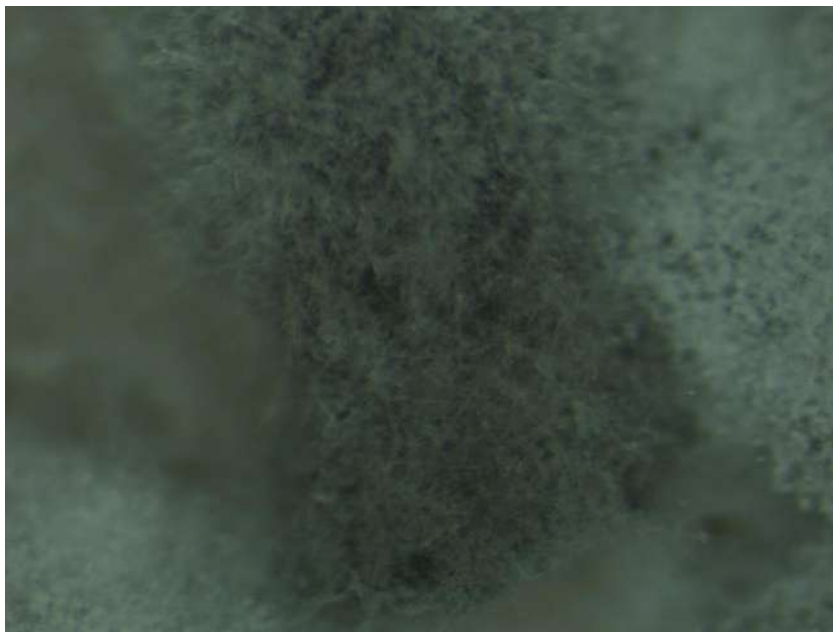


*Figura 39: Observació mostra R21-22 ( N<sup>o</sup> augments 10 x 5), Font: Elaboració pròpia*



*Figura 40: Observació mostra R21-22 ( N<sup>o</sup> augments 4 x 5), Font: Elaboració pròpia*

## Annex I.II Observacions microscòpiques població R23-24



*Figura 41: Observació mostra R23-24 ( N° augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia*



*Figura 42: Observació mostra R23-24 ( N° augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia*



### Annex I.III: Observacions microscòpiques població R27-28

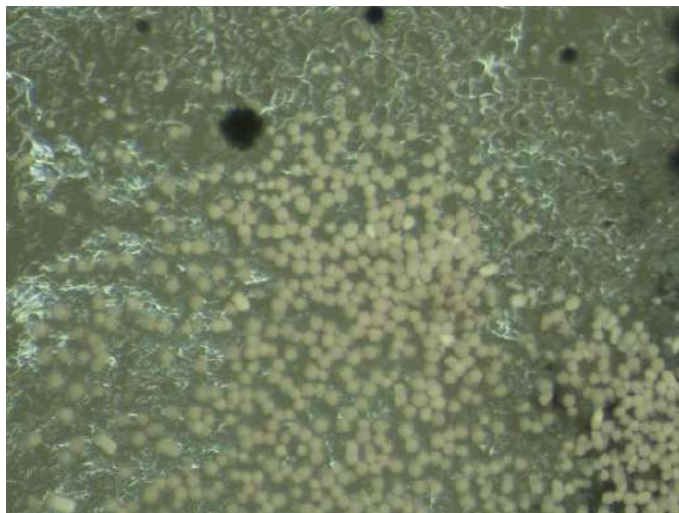


Figura 43: Observació mostra R27-28 ( N<sup>o</sup> augments 6,3 x 5), Font: Elaboració pròpia

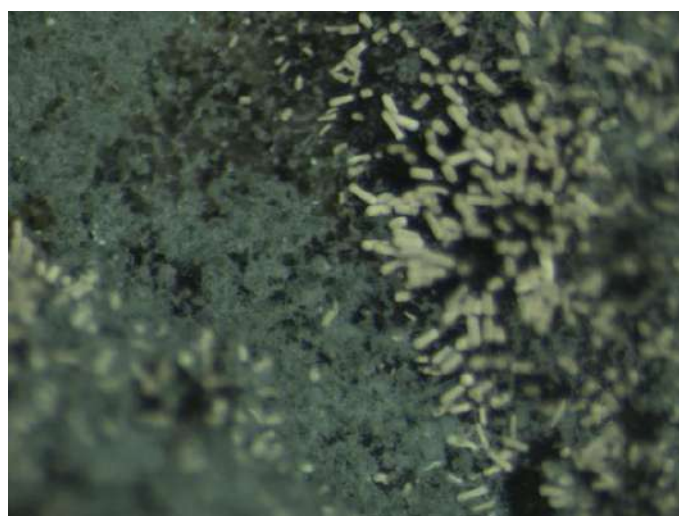
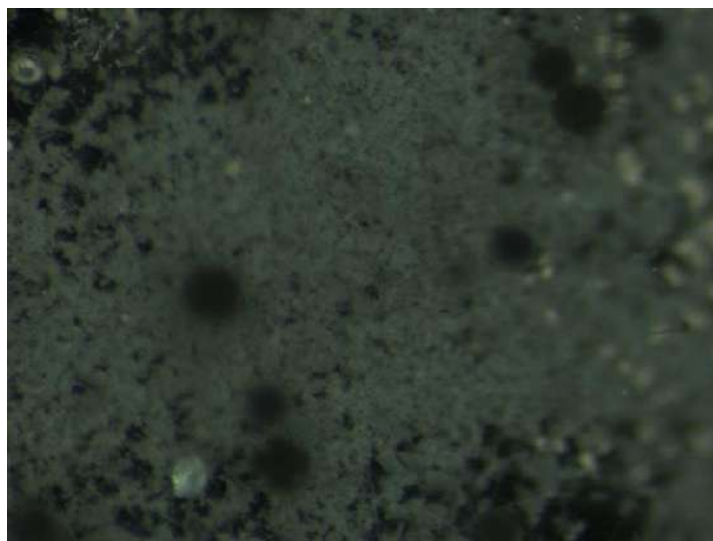


Figura 44: Observació mostra R27-28 (N<sup>o</sup> augments 6,3 x 5), Font: Elaboració pròpia



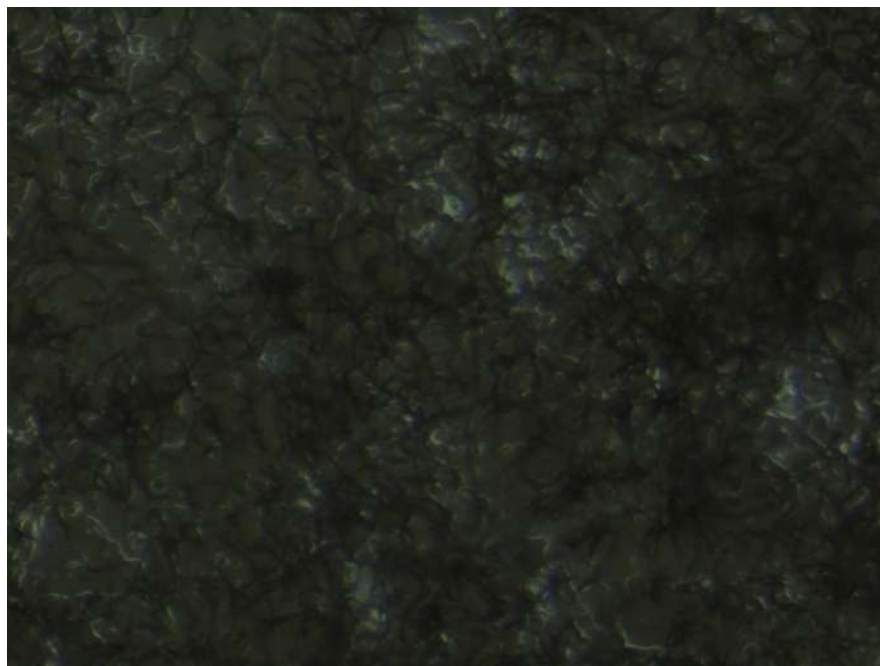
*Figura 45: Observació mostra R27-28 (Nº augments 8 x 5), Font: Elaboració pròpia*



*Figura 46: Observació mostra R27-28 (Nº augments 6,3 x 5), Font: Elaboració pròpia*



## Annex I.V Observacions microscòpiques població R29-30



*Figura 47: Observació mostra R29-3 (ONº augments 10 x 5), Font: Elaboració pròpia*

## Annex II: Fitxa tècnica patró Procaine Benzylpenicillin CRS Batch 4

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare  
European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)  
7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France)  
Tel. +33 (0)3 88 41 20 35 Fax. +33 (0)3 88 41 27 71  
For any questions: [www.edqm.eu](http://www.edqm.eu) (HelpDesk)



### INFORMATION LEAFLET Ph. Eur. Reference Standard

#### Procaine benzylpenicillin CRS batch 4

#### 1. Identification

Catalogue code: P3090000

Unit Quantity: ca 250 mg

#### 2. Scientific Information

##### 2.1 Intended use

Reference Standard for laboratory tests as prescribed in the European Pharmacopoeia only.  
Established for use with the monograph(s): 0115.

##### 2.2 Analytical information related to intended use, when applicable

The "as is" content is : **96.8% C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S**  
**40.1% C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (procaine)**

##### 2.3 Uncertainty of the assigned value, when applicable

The uncertainty of the assigned value is not stated since it is considered to be negligible in relation to the defined limits of the method-specific assays for which the reference standard is used. Please also refer to Ph. Eur. chapter 5.12.

##### 2.4 Validity

Ph. Eur. RS are periodically tested to ensure their continuous fitness for purpose. For each valid Ph. Eur. RS, a Batch Validity Statement at the time of use can be downloaded and printed from the EDQM website (Reference Standards Database).

##### 2.5 Instructions for use

The container should not be opened until required for use. Allow the closed container to equilibrate at ambient temperature before opening to avoid uptake of moisture. Use "as is". Do not dry/desiccate before use. Ph. Eur. RS are for immediate use. Once the container has been opened, its entire content must be used immediately. Any further storage and re-use are not warranted.

#### 3. Storage conditions

In the original container at +5°C ± 3°C, protected from light. Re-instate promptly upon receipt.

#### 4. Safety

For scientific research, development and analysis only. Handle in accordance with good occupational hygiene, safety and laboratory practices and take precautions to avoid exposure. More information is available at the EDQM website (Reference Standards Database): Safety Data Sheet for hazardous chemicals and Safety Data Statement for other materials.

#### 5. Shipping conditions

Each Ph. Eur. RS is shipped under conditions that preserve its suitability for use and comply with the relevant regulations. For more details see EDQM website (Reference Standards Database).

#### 6. Warranties, Liabilities and responsibility

##### - Safety

In the event of any safety concerns, please read carefully the safety data sheets or safety data statements available for each product. It is for Purchasers to determine independently the risks associated with the items and to take appropriate safety measures, including the provision of appropriate information, equipment and training of those persons coming into contact with the item.

##### - Warranties

Except for the use of Reference Standards in tests and assays carried out in accordance with the official methods of the European Pharmacopoeia and by professionals with the necessary technical skills and at their own discretion and risk, the EDQM makes no representation, contractual statement, or expression of opinion concerning the quality or safety of any item supplied, the presence of any defect in it, or its fitness for any particular purpose except that as described above.

Signed on: 18/12/2015  
FORM/597 Rev. 01 [16/01/2017]



Rev.3 1/2

The EDQM does not guarantee that the items will meet the Purchaser's specific expectations. The EDQM only guarantees that the items (i) were fit for use according to EDQM's intended use of the product ;(ii) were fit for use at the moment that they were handed over to the carrier being responsible for the delivery of the items to the Purchaser with such accessories including packaging, delivery instructions or other instructions for the item's delivery and reception as the Purchaser may expect to receive; and (iii) possess qualities and performance capabilities which are normal in goods of the same type and which the Purchaser may expect given the nature of the goods and the information provided on the EDQM's website and (iv) the carrier and the Purchaser received clear and accurate instructions for the item's delivery and reception. No other guarantees, whether explicitly or implied, are given by the EDQM. The EDQM does not guarantee that the purchase or use of the items will not infringe any intellectual property rights, in particular patents.

*- Limitation of Liability*

In no event shall the EDQM be liable for any damages due to the use of items, included, but not limited to loss of business, loss of profit, loss of use, loss of opportunity, costs of procurement of substitute goods, services or systems or for any indirect, special, incidental, punitive or consequential damages, however caused and, whether in contract, tort or under any other theory of liability, whether or not the Purchaser has been advised of the possibility of such damages or costs.

Any liability of the EDQM for injury, loss or damage arising from the supply or use of any such item is in any event hereby excluded to the fullest extent permitted internationally accepted commercial standards; in particular, no liability is accepted for loss of profits or indirect or consequential loss.

**7. Arbitration & Applicable Law**

The aim of the EDQM is to settle any disputes amicably in the framework of its Terms and Conditions. In accordance with the provisions of article 21 of the General Agreement on the Privileges and Immunities of the Council of Europe, all disputes between the EDQM and the Purchaser as regards the application of these General Terms shall be submitted, if a mutual agreement cannot be reached between the parties, to arbitration as laid down in Order No. 481 of the Secretary General, approved by the Committee of Ministers.

This transaction shall be governed by the Council of Europe's relevant regulatory framework, complemented, where necessary, by French national substantive law.

**8. Citation**

Users shall ensure that any reference made to an EDQM Reference Standard in any publication, presentation or public document (ex. scientific articles, data sheets for kits) bears the exact name, and catalogue code of the Reference Standard and the exact name and address of EDQM as given on the first page of this information leaflet.

**9. Adoption**

The suitability for intended use has been officially adopted by the European Pharmacopoeia Commission.

**10. Signature**

This document is electronically signed by:

**Dr Pierre Leveau**  
**Head of the Quality, Safety and Environment Division**

## Annex III: Especificacions tècniques dels mètodes cromatogràfics

### Annex III.I : Condicions d'assaig per la detecció de Penicillin G Procaine Salt Monohydrate (Sigma-Aldrich)

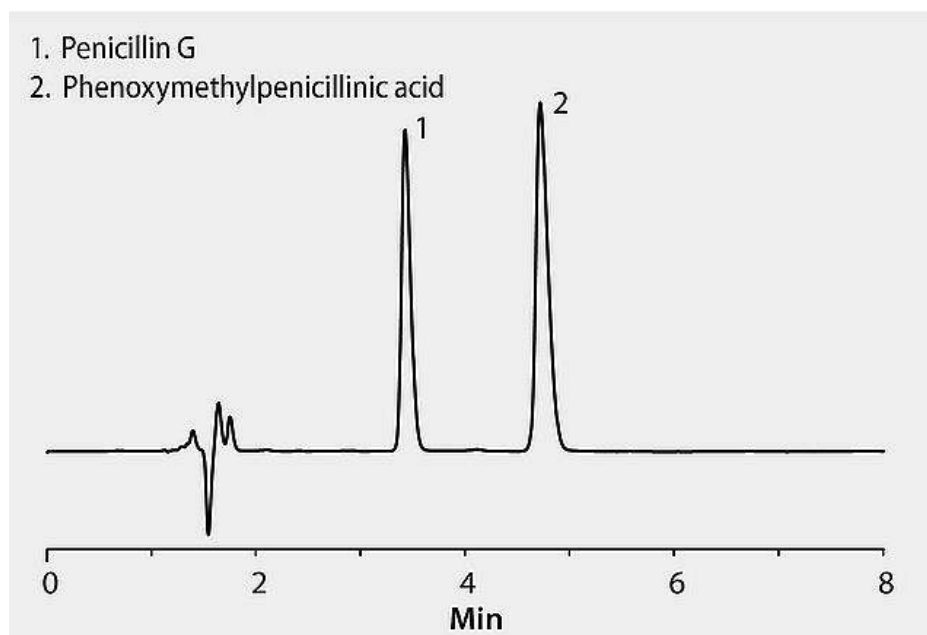


Figura 48: Cromatograma obtingut del mètode operatori de Sigma-Aldrich per la detecció de PenG


El pic 1 correspon al patró de "Penicillin G procaine salt monohydrate". El pic 2 correspon a la substància proposada per actuar com a patró intern.

**A) Condicions d'assaig del patró Penicillin G Procaine Salt Monohydrate (Recomanacions de Sigma Aldrich) per metodologia HPLC-DAD en isocràtic**

***Condicions d'assaig del patró (Recomanacions de Sigma Aldrich) per metodologia HPLC-DAD en isocràtic***

<b>Columna</b>	Ascentis C18, 15 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm particles (581324-U)
<b>Temperatura de columna</b>	35 °C
<b>Fase mòbil</b>	[A] 10 mM d'acetat d'amoni (pH 4.5 acetic acid): [B] acetonitril, (75:25, A:B)
<b>Flux de treball</b>	1 mL/min
<b>Concentració patró (Fig.1)</b>	100 µg/mL dissolt en fase mòbil
<b>Volum de injecció</b>	10 µL
<b>Longitud d'ona de treball</b>	220 nm

**a**



**P3090000**  
**Procaïne benzylpenicillin**  
European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard

Synonyms:  
Penicillin G procaïne salt monohydrate  
Empirical Formula (Hill Notation):  
 $C_{24}H_{35}N_2O_6S_2 \cdot C_{12}H_{20}N_2O_2 \cdot H_2O$

CAS Number: **6130-64-9** Molecular Weight: 588.72 NACRES: NA,24

SKU	Pack Size	Availability	Price	Quantity
P3090000		Available to ship on June 10, 2021 - FROM	€137.00	<input type="text" value="1"/>

[Request a Bulk Order](#) [Add To Cart](#)

## Annex IV: Resultats experimentals: cromatogrames i espectres UV

### Annex IV.I Cromatograma i espectres UV de la recta de calibratge

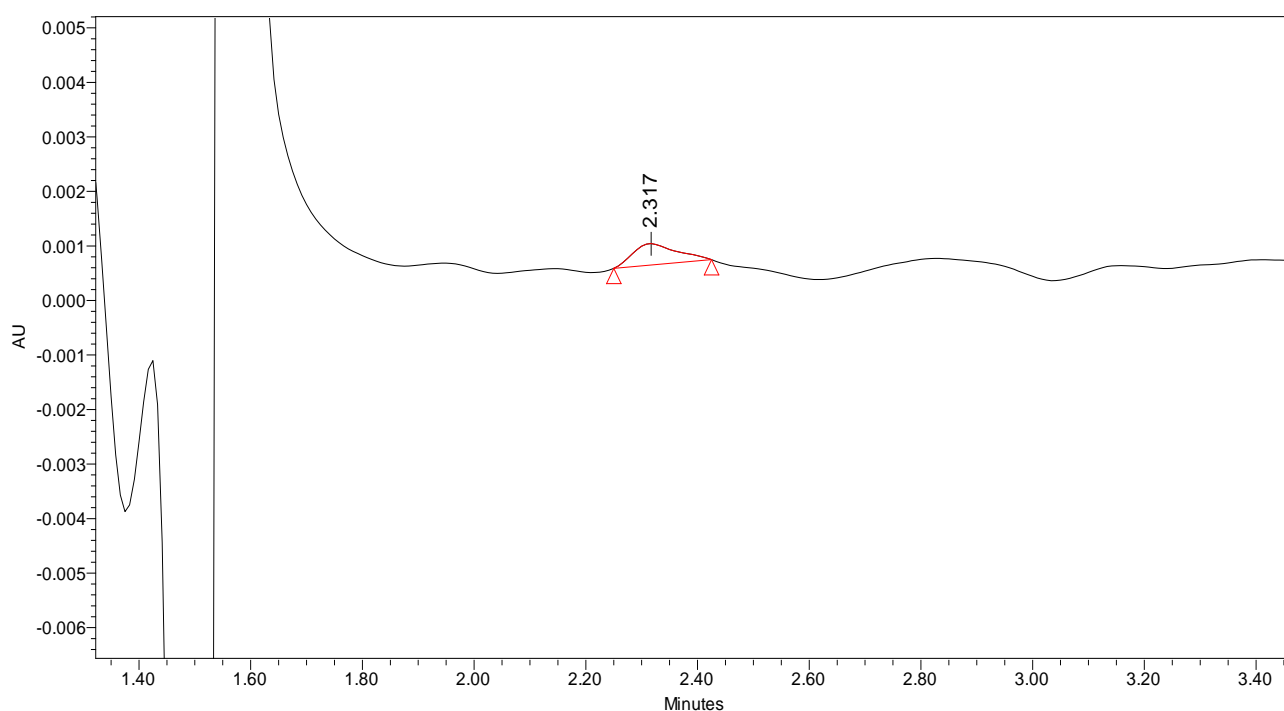


Figura 49: Cromatograma patró blanc

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		2.316900351	2135.128077	100	391.046619



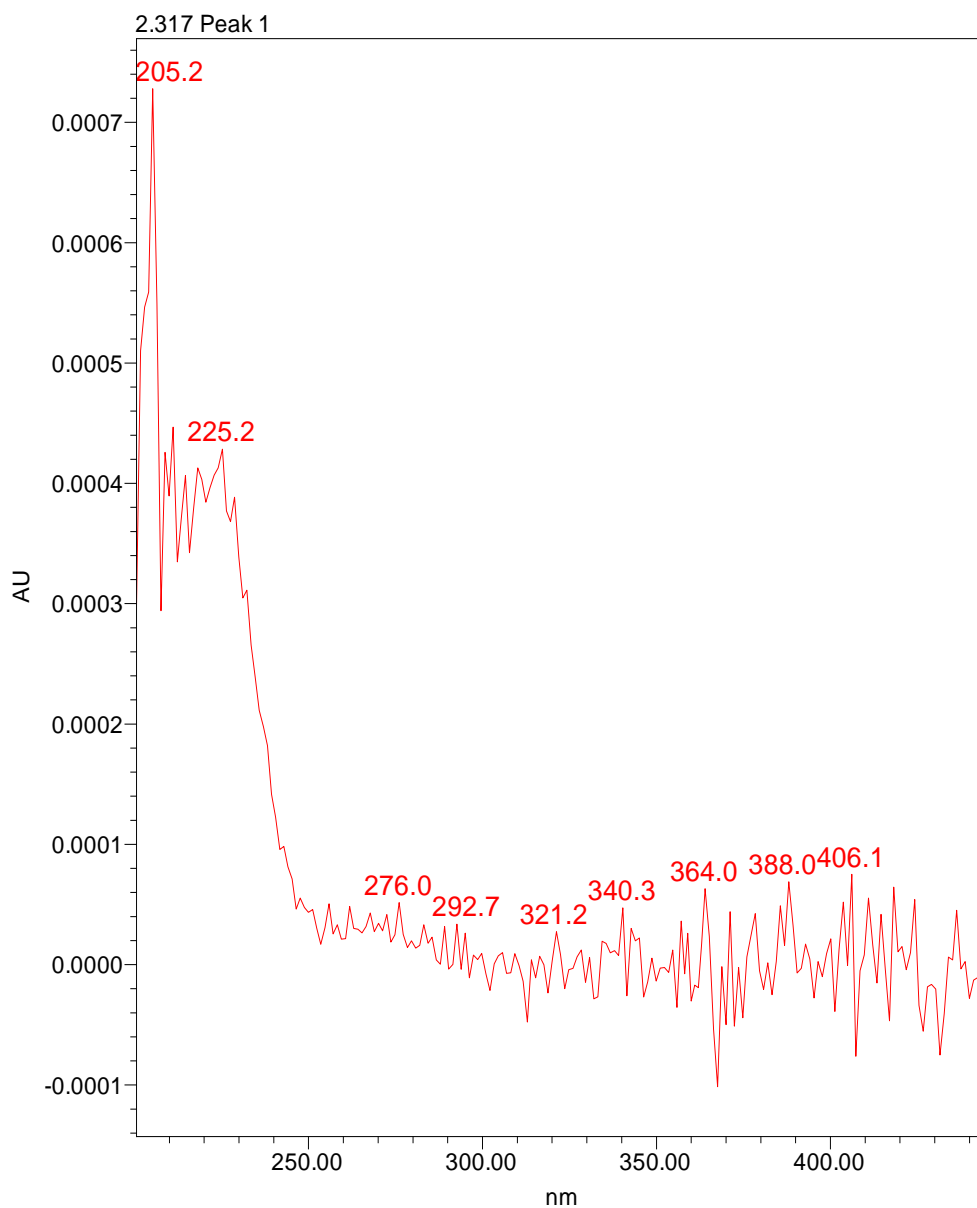


Figura 50: Espectre UV patró blanc

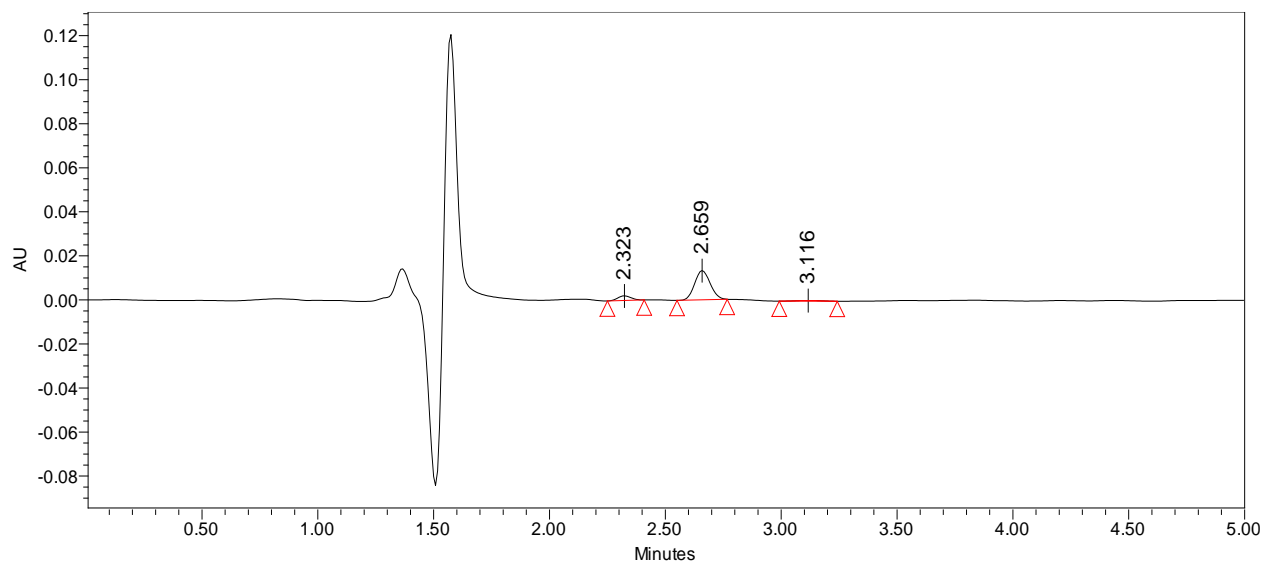


Figura 51: Cromtograma patró Bencilpenicilina Procaïna 1mg/L

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.323	8,408.6	11.5
2	Penicillin G	2.659	61,856.9	84.8
3		3.116	2,676.3	3.7



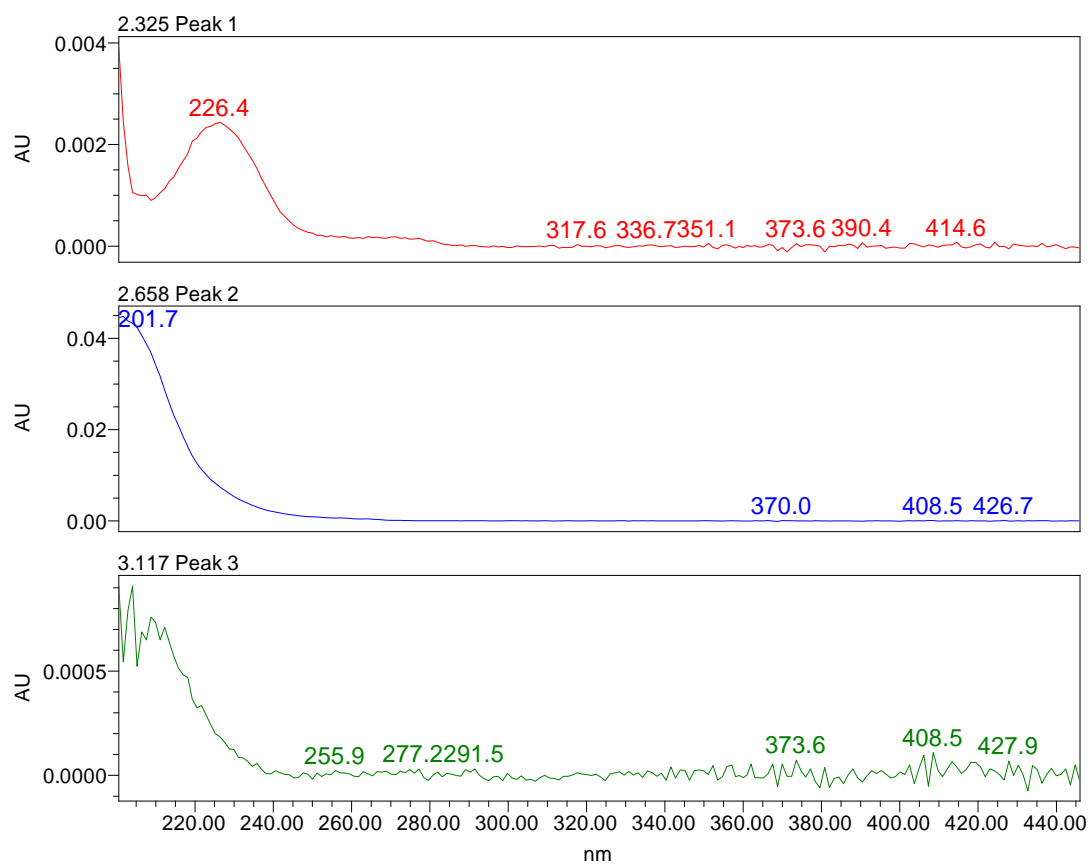


Figura 52: Espectre UV-Visible patró Bencilpenicilina Procaina 1mg/L

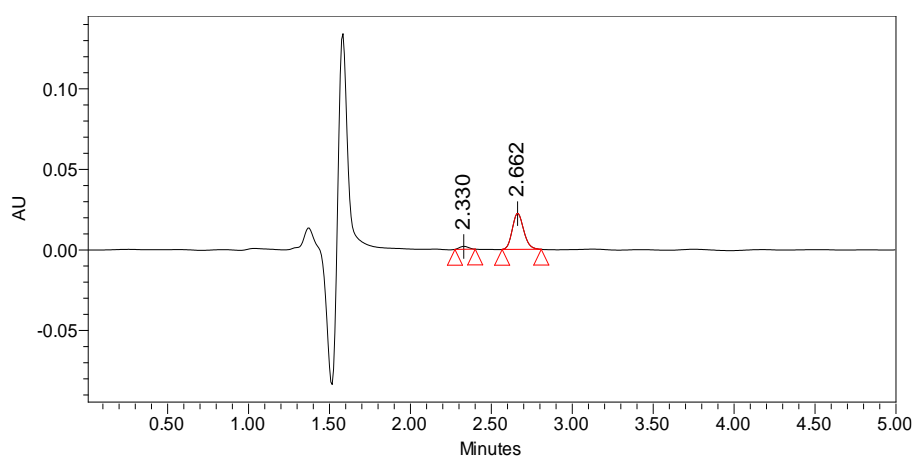


Figura 53: Cromatograma patró intern Bencilpenicilina Procaïna 2mg/L

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.330	6948.2	6.0
2	Penicilin G	2.662	109460.9	94.0

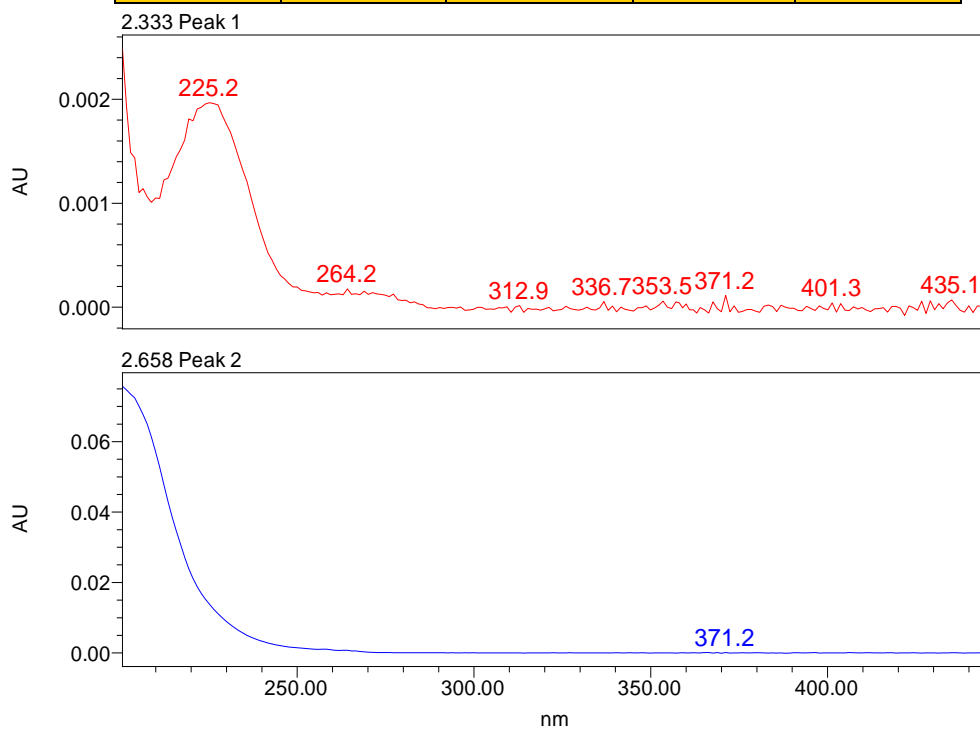


Figura 54: Espectre UV-Visible patró Benilpenicilina Procaïna 2mg/L

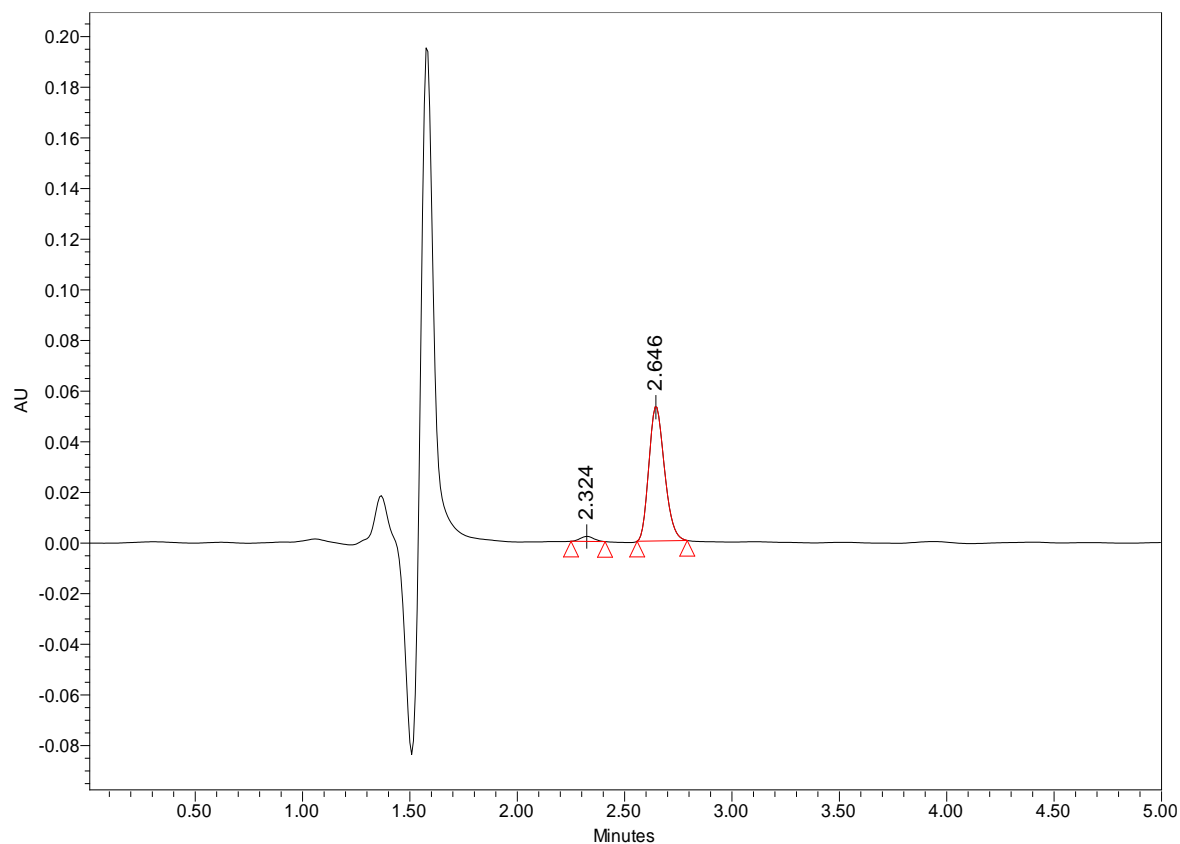


Figura 55: Cromatograma patró Bencilpenicilina Procaïna 5mg/L

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.323	8700.69703	3.13943967
2		2.645	268441.021	96.8605603

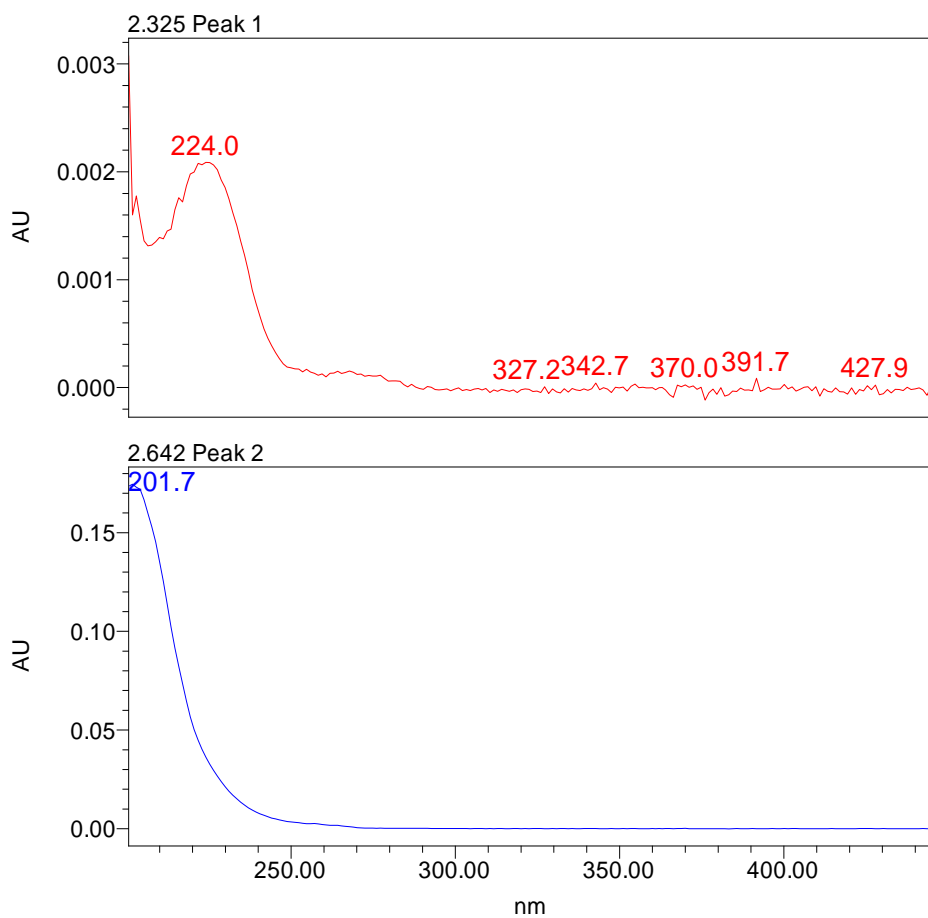


Figura 56: Espectre UV-Visible Bencilpenicilina Procaïna 5mg/L

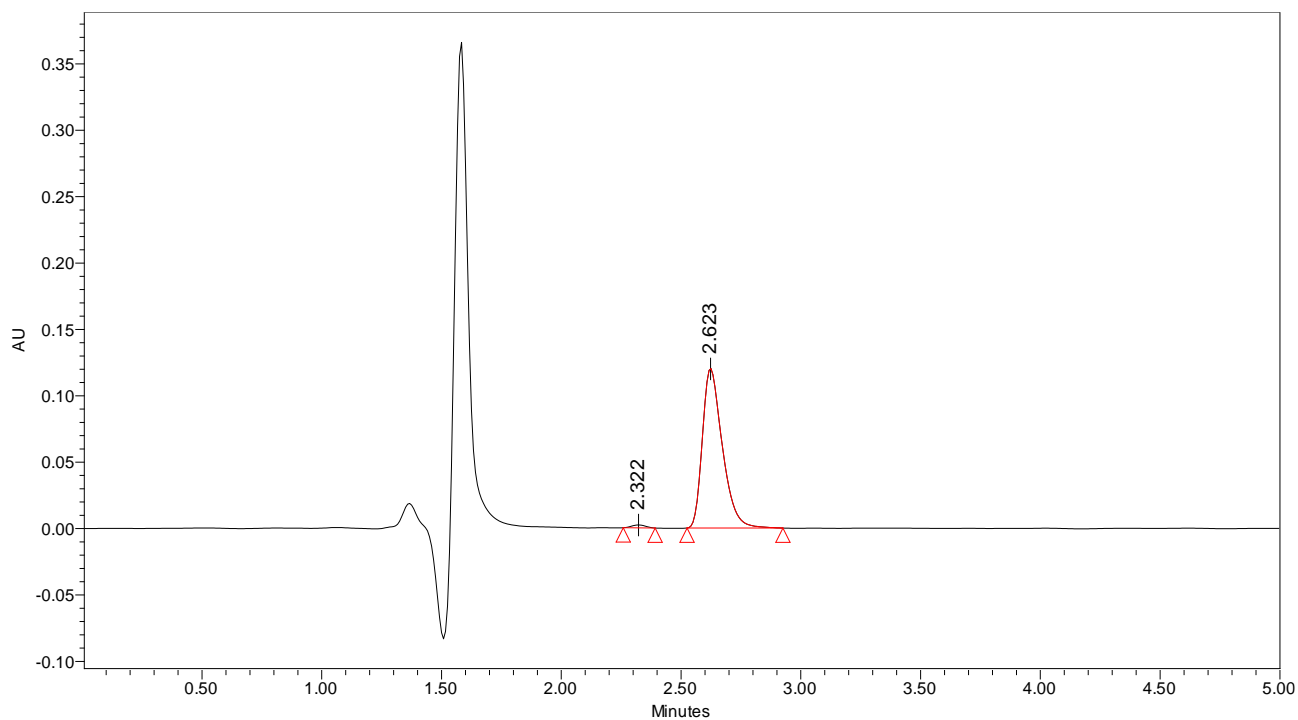


Figura 57: Cromatograma Bencilpenicilina Procaïna 10mg/L

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.322159262	8624.58778	1.22278114
2		2.623	696700.96	98.7772189

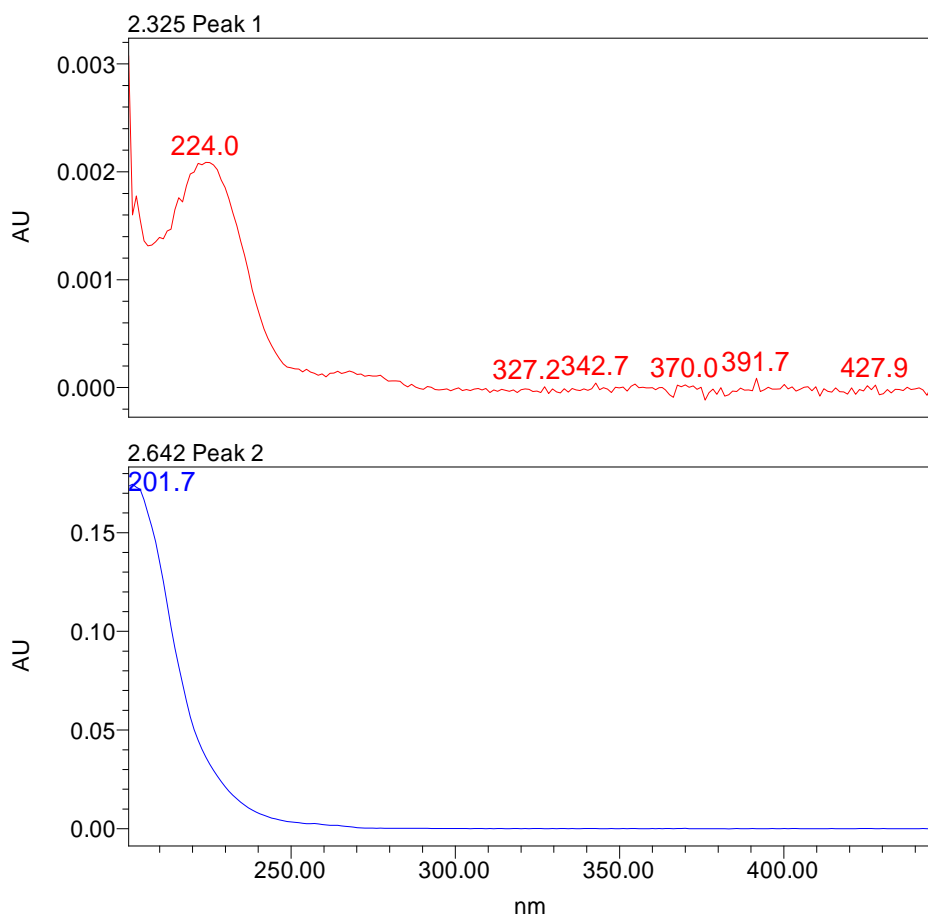


Figura 58: Espectre UV-Visible Benzilpenicilina Procaïna 10mg/l

## Annex IV.II Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R21

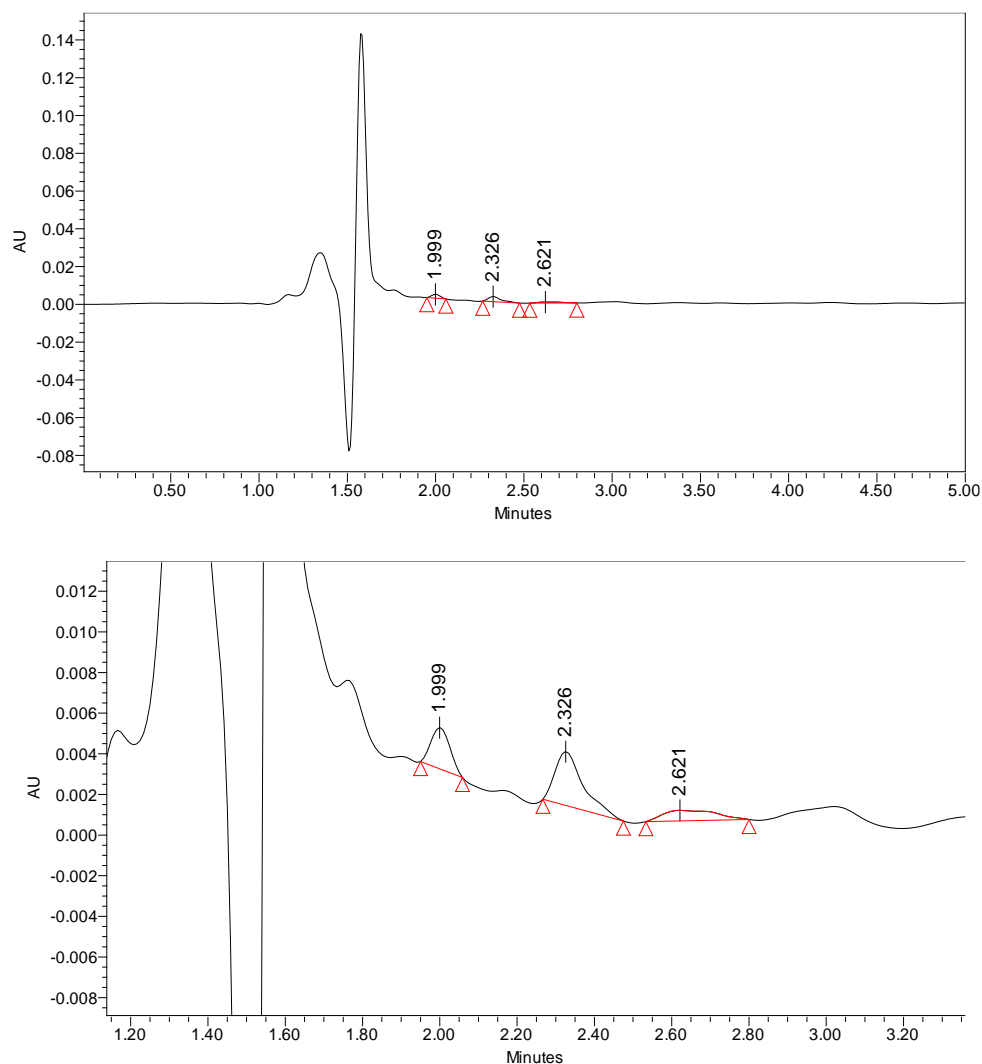


Figura 59: Cromatograma mostra R21

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.999457936	6919.03569	27.4176501
2		2.325883598	13394.1614	53.0762445
3	Penicilin G	2.621474119	4922.50209	19.5061054

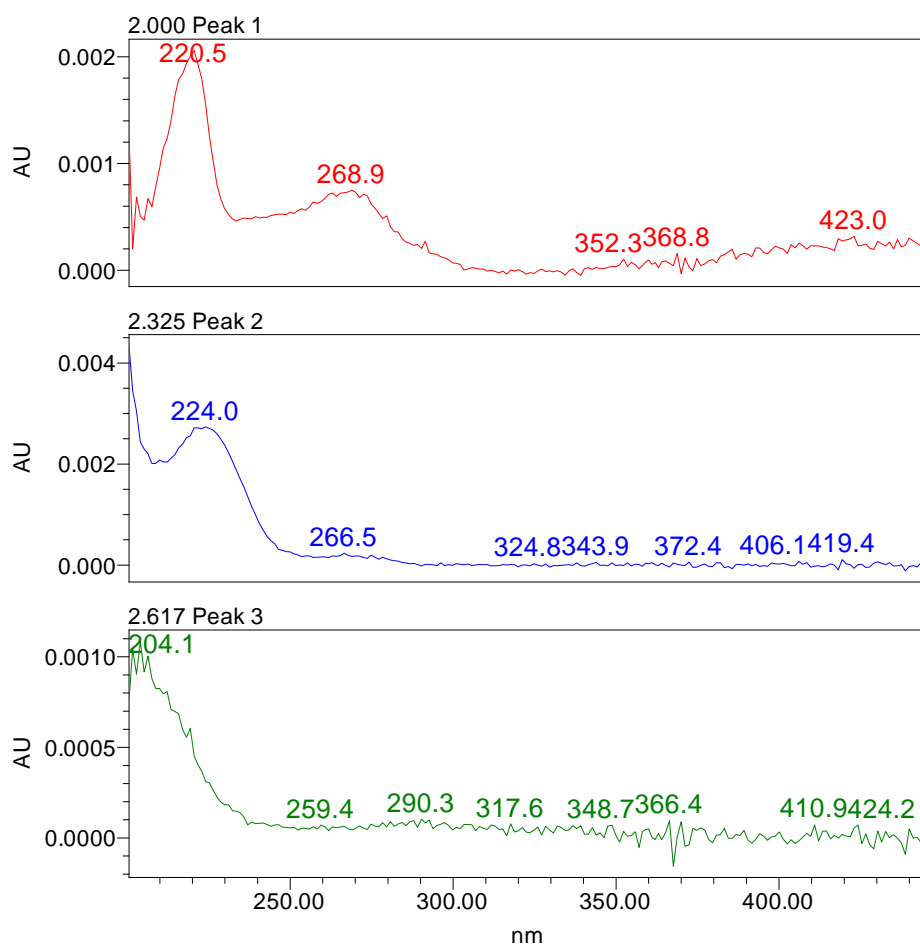
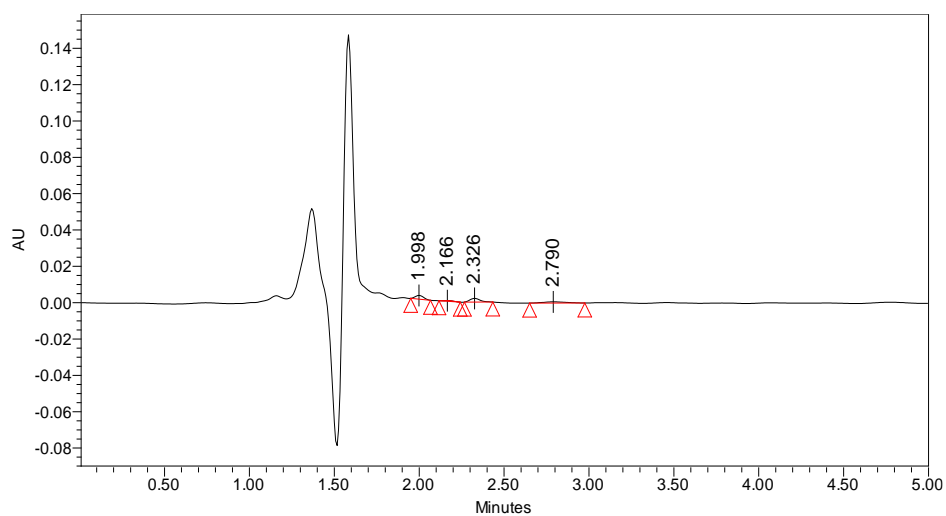


Figura 60: Espectre UV-Visible mostra R21

### Annex IV.III Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R22





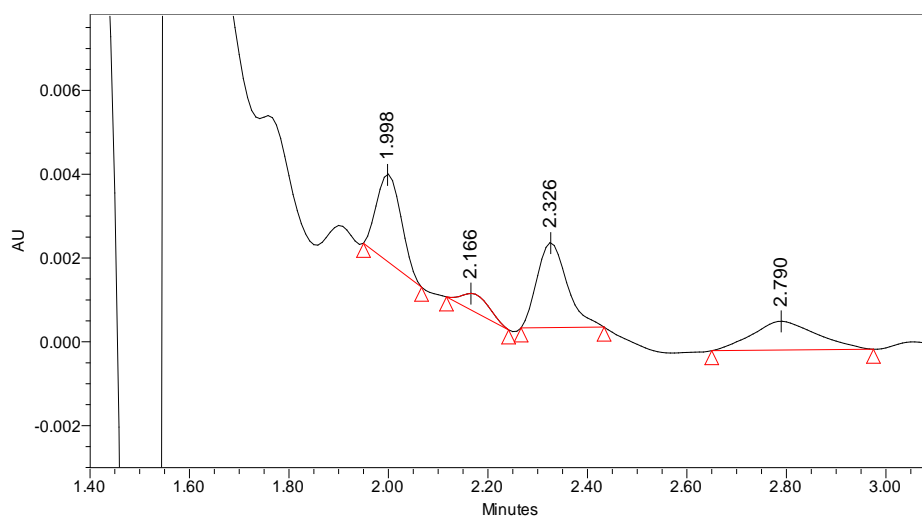


Figura 61: Cromatograma mostra R22

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.99837978	7172.4845	30.5011566
2		2.16581425	1646.69701	7.0026172
3		2.32616846	8491.4169	36.1099472
4		2.78959374	6204.85247	26.386279

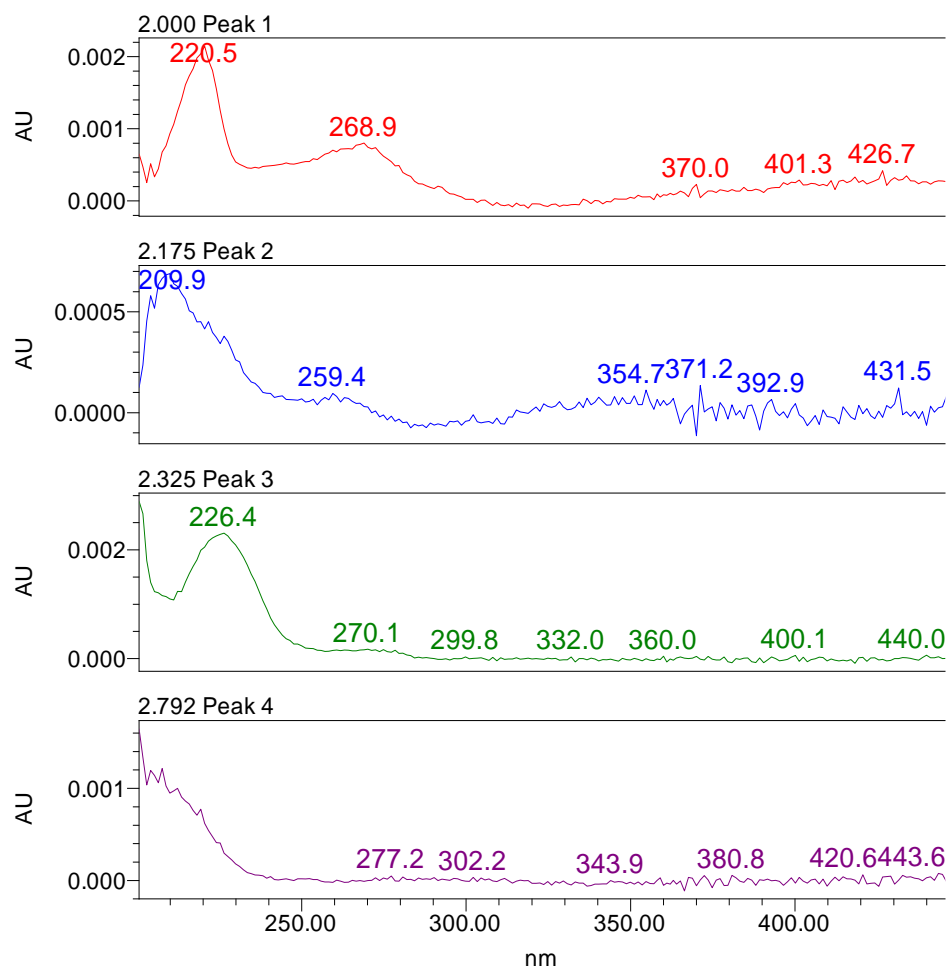


Figura 62: Espectre UV-Visible mostra R22

## Annex IV.IV Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R23

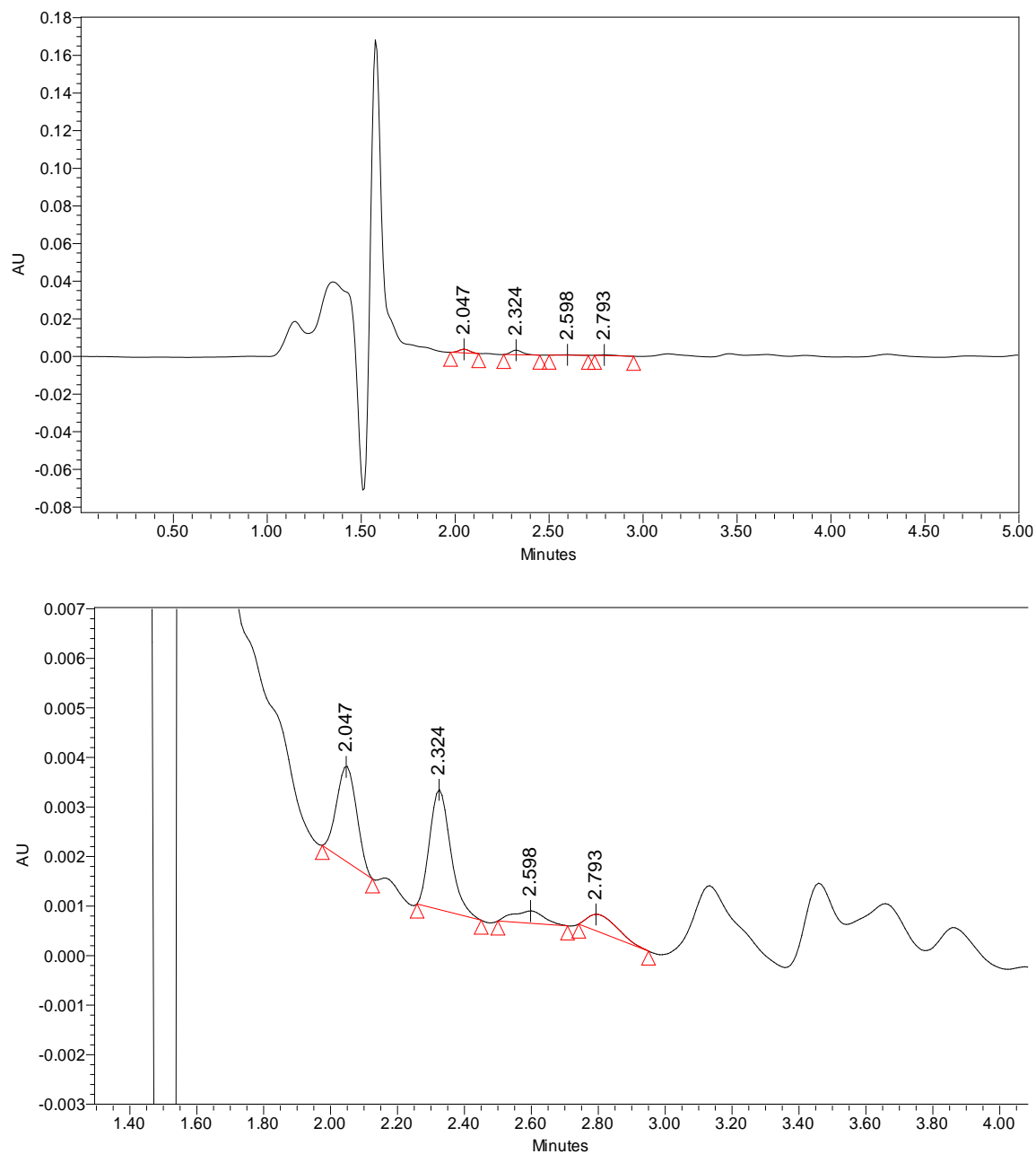


Figura 63: Cromatograma mostra R23

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.04677102	7910.62268	35.7180388
2		2.32434442	10490.4582	47.3665104
3	Penicilin G	2.59755329	1601.1155	7.22935575

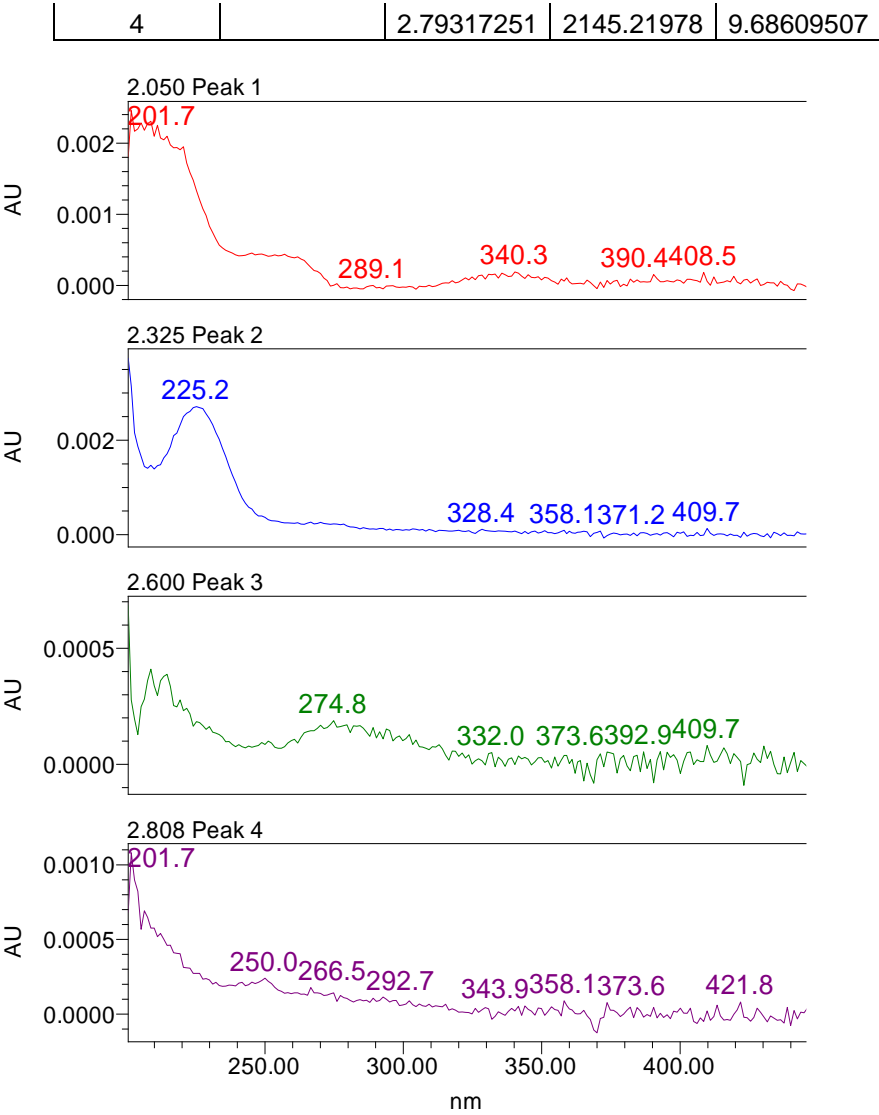


Figura 64: Espectre UV-Visible mostra R23

## Annex IV.V Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R24

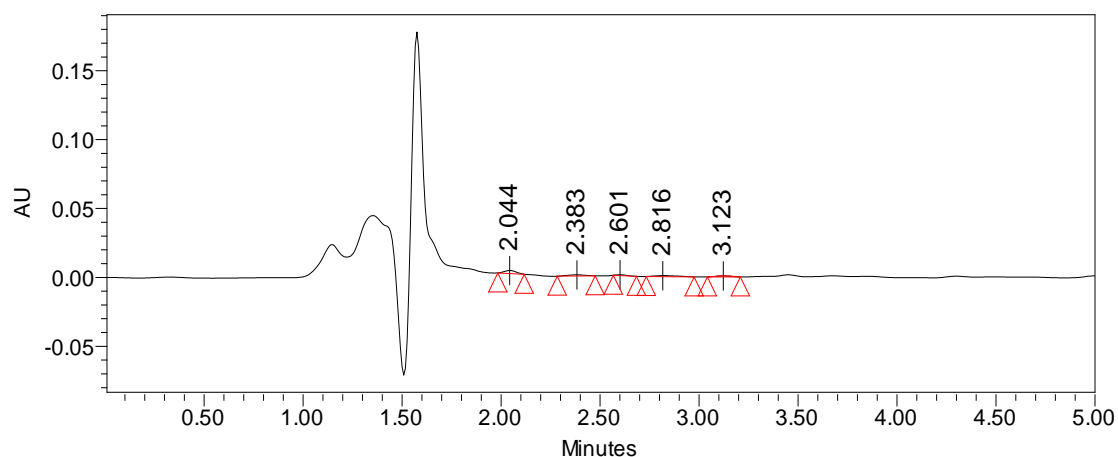
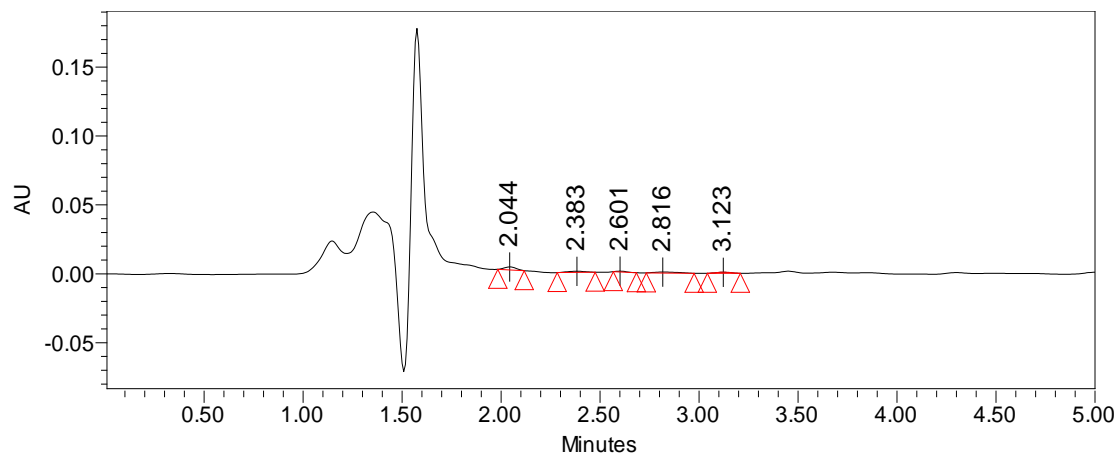


Figura 65: Cromatograma mostra R24

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		2.04368962	9047.9843	33.3306233
2		2.38288548	5352.41543	19.7170261
3	Penicilin G	2.60070848	2259.76105	8.32442255
4		2.81630977	6381.71041	23.5087041
5		3.1227343	4104.28869	15.1192239

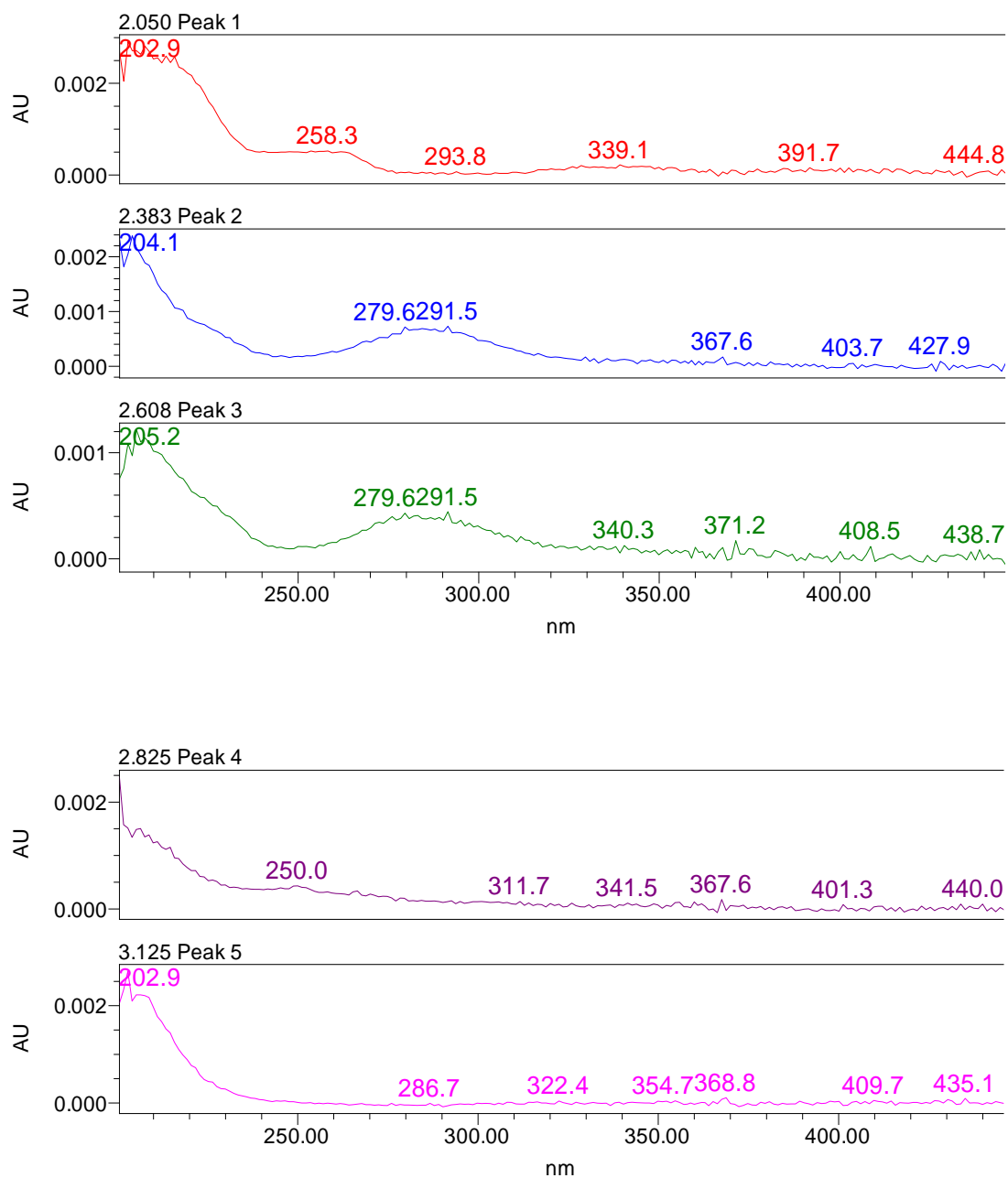


Figura 66: Espectre mostra R24

## Annex IV.VI Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R25

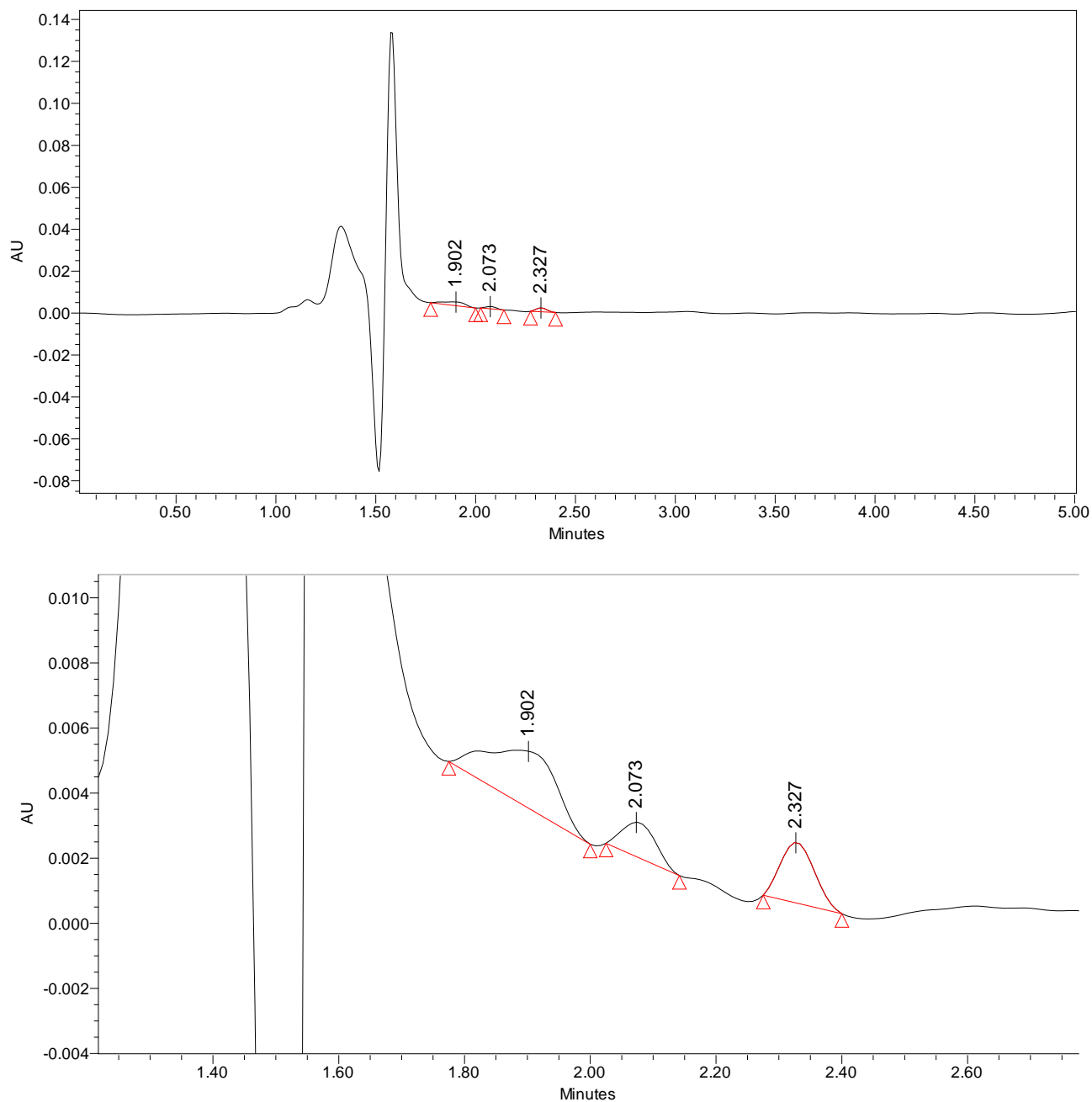


Figura 67: Cromatograma mostra R25

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.90169584	13236.6126	54.6026588
2		2.07319944	4016.76298	16.5696425
3		2.32695969	6988.32414	28.8276987

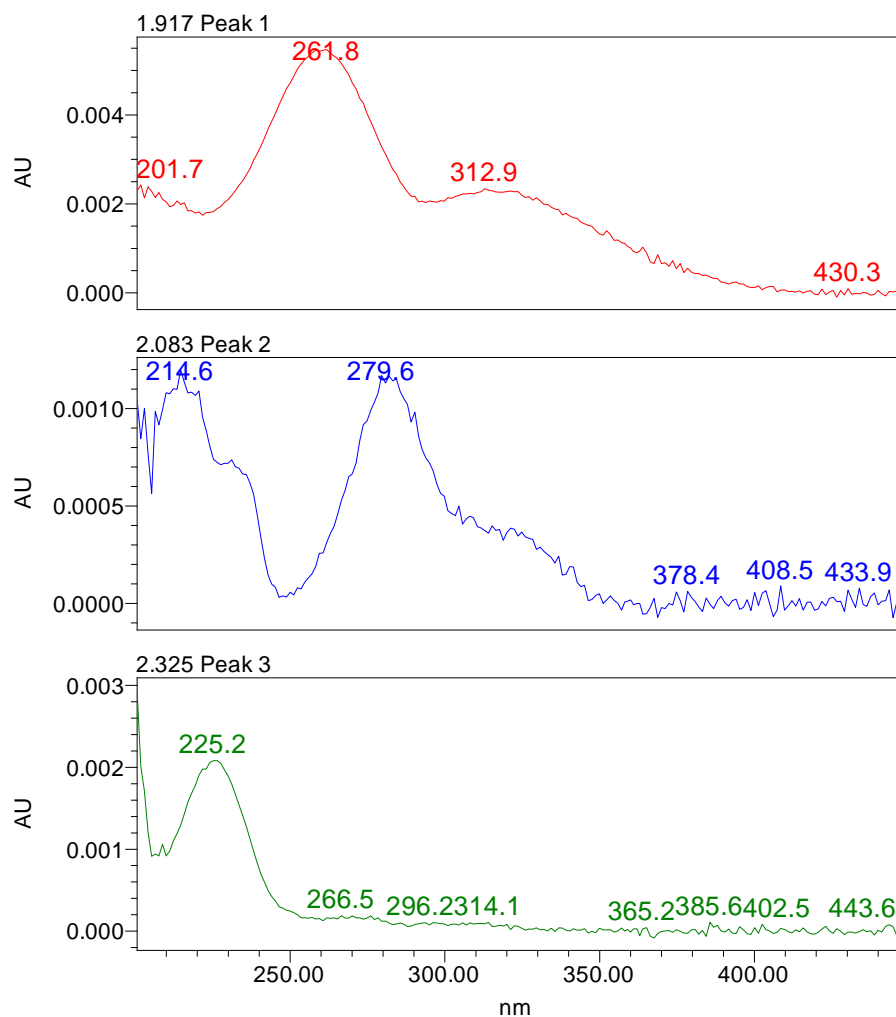


Figura 68: Espectre UV-Visible mostra R25



## Annex IV.VII Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R26

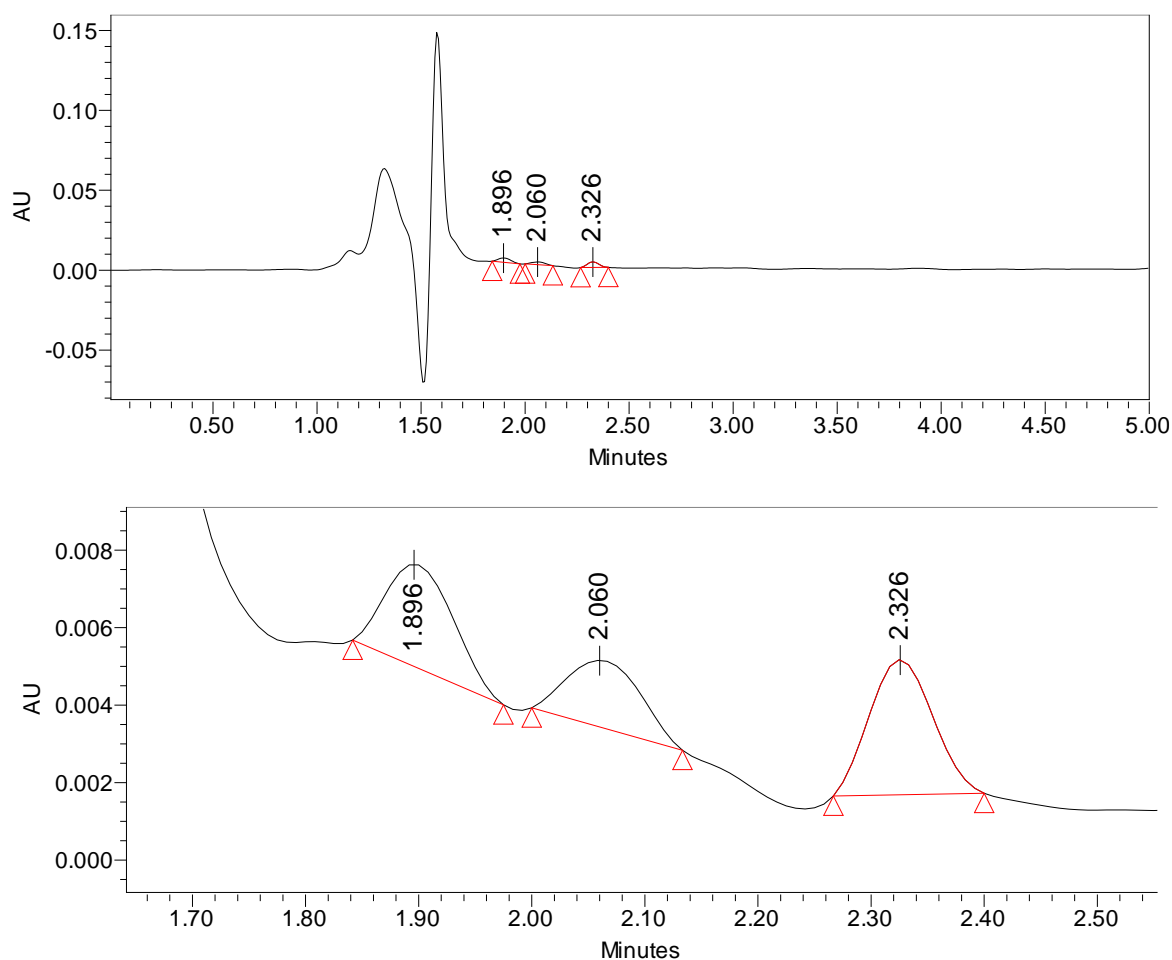


Figura 69: Cromatograma mostra R26

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.89593744	11146.5006	34.1228798
2		2.05998842	7898.98679	24.1812374
3		2.32570556	13620.2801	41.6958828

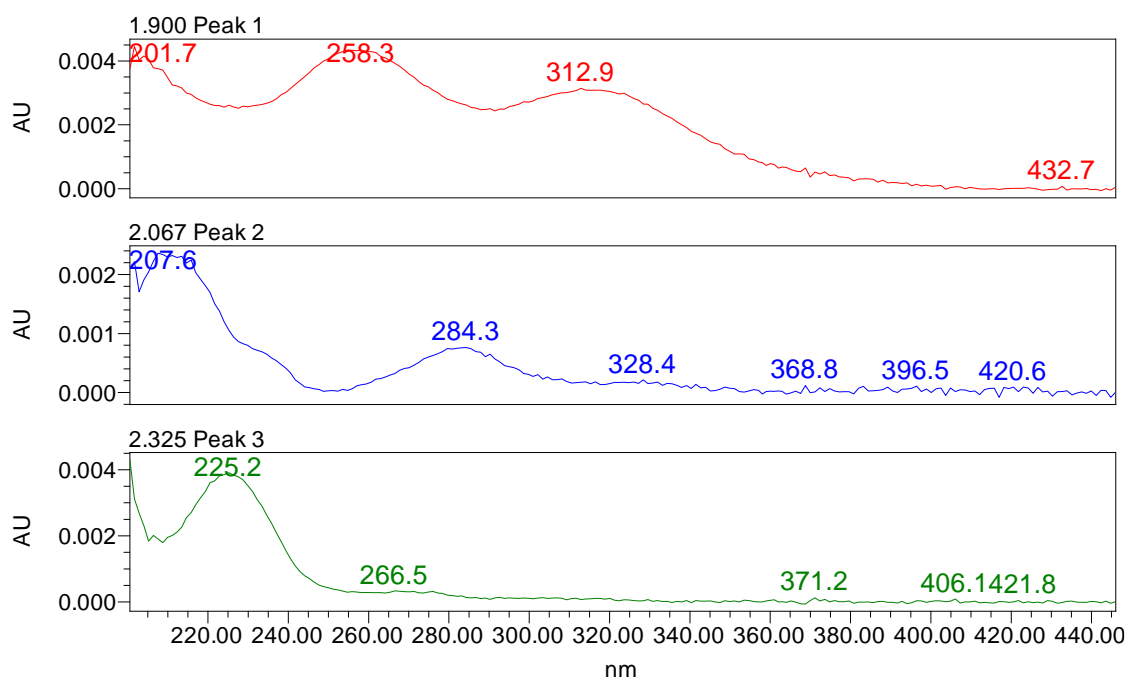


Figura 70: Espectre UV-Visible mostra R26

## Annex IV.VIII Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R27

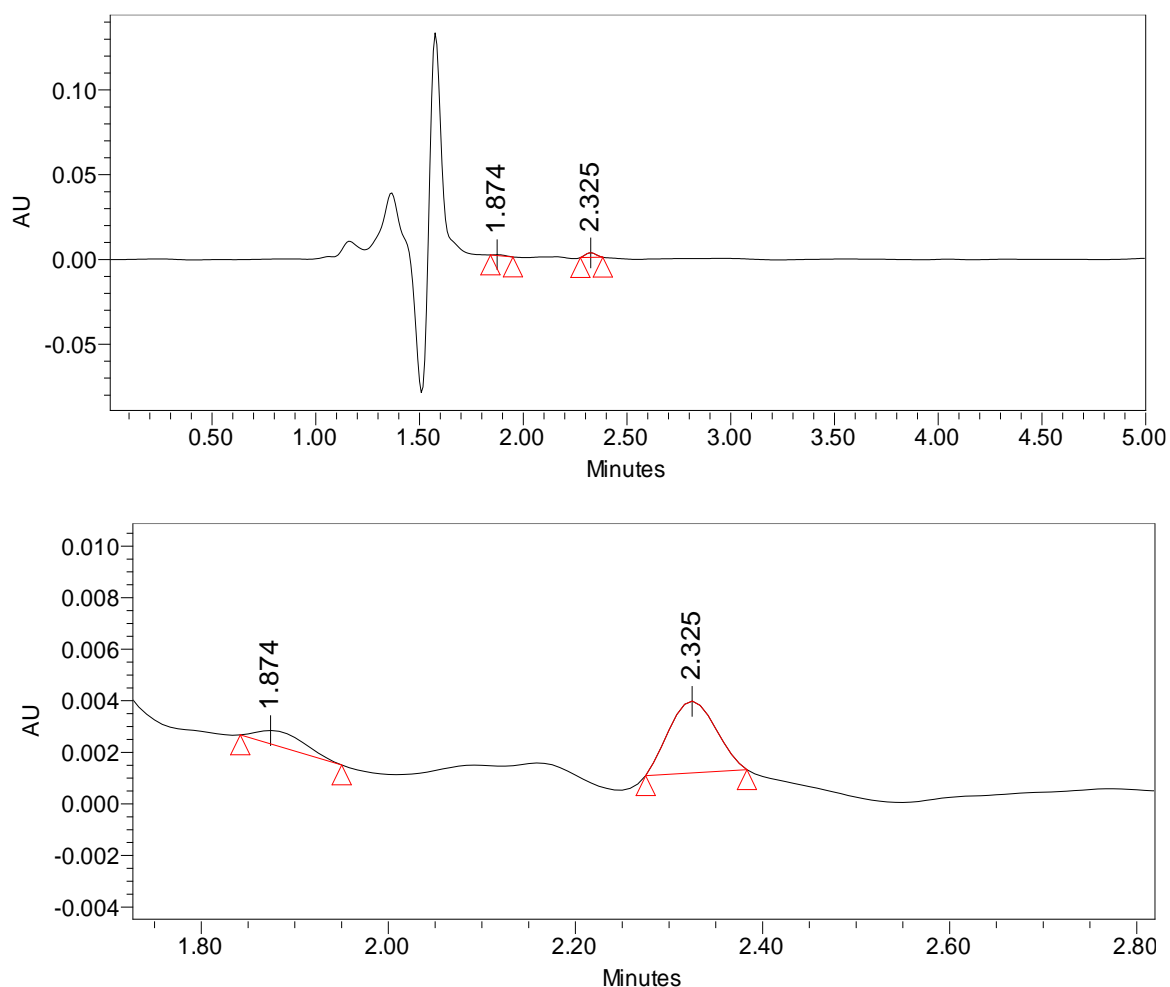


Figura 71: Cromatograma mostra R27

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.87415987	2078.88115	17.5869698
2		2.32466005	9741.69498	82.4130302

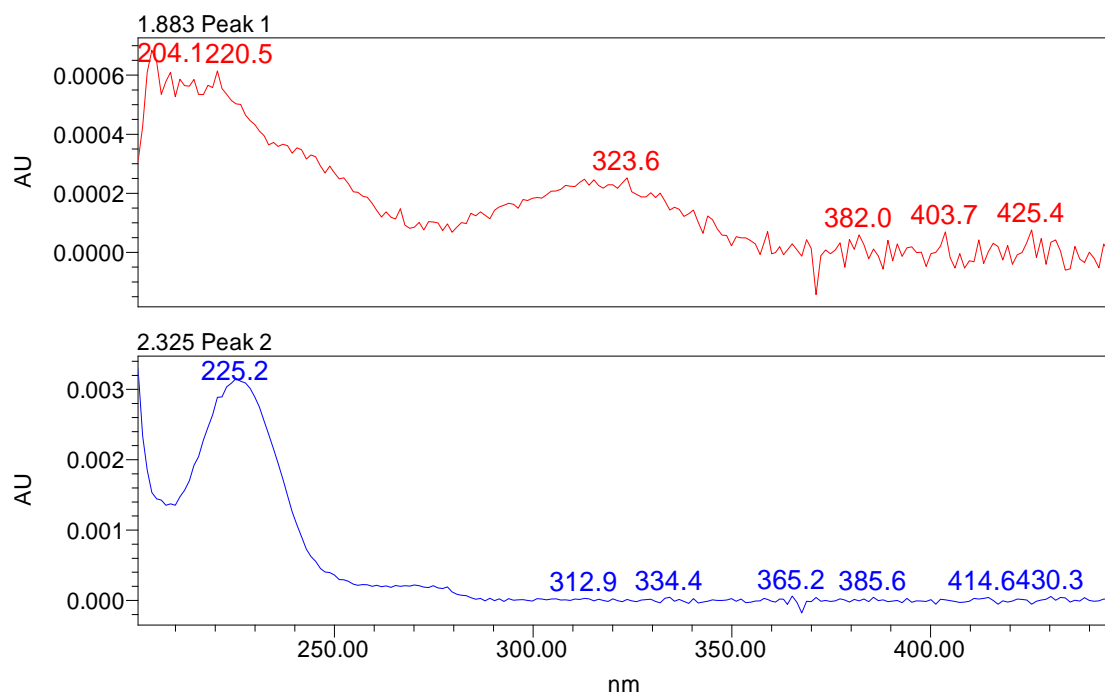
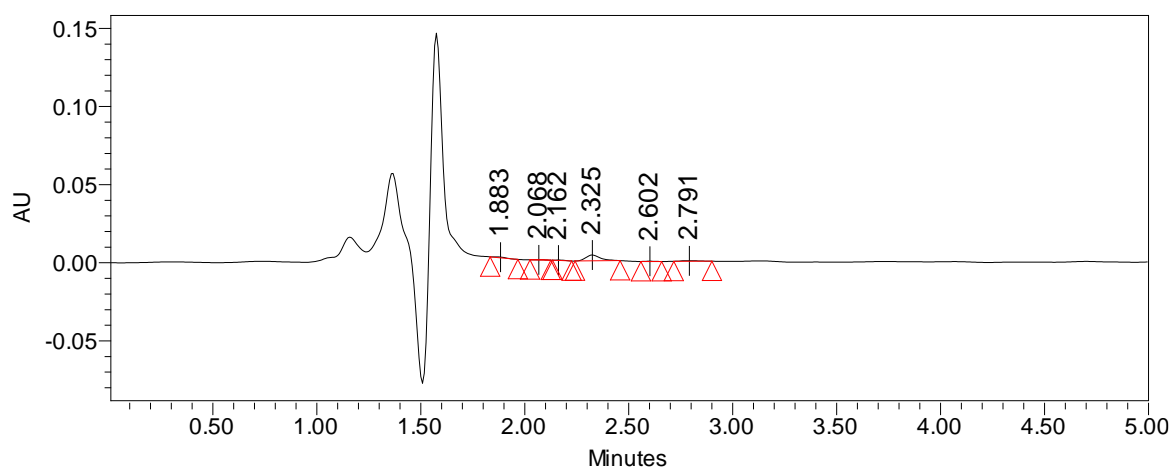


Figura 72: Espectre UV-Visible mostra R27

## Annex IV.IX Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R28



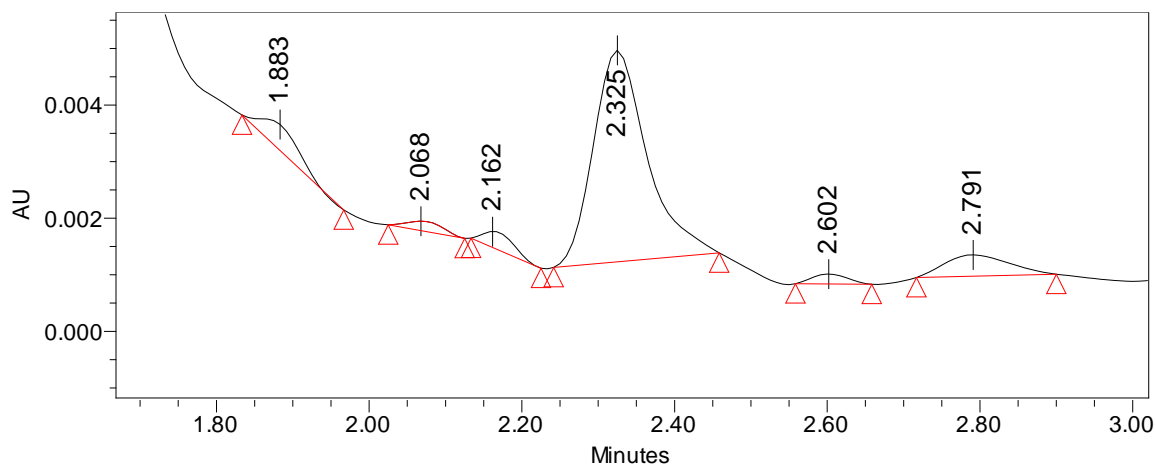


Figura 73: Cromatograma mostra R28

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.88333333	1598.71428	6.63697806
2		2.06786881	566.109464	2.3501736
3		2.16170129	855.863045	3.55307032
4		2.32515646	18291.5769	75.9365173
5	Penicilin G	2.60184151	570.100115	2.36674058
6		2.79126272	2205.62119	9.15652013

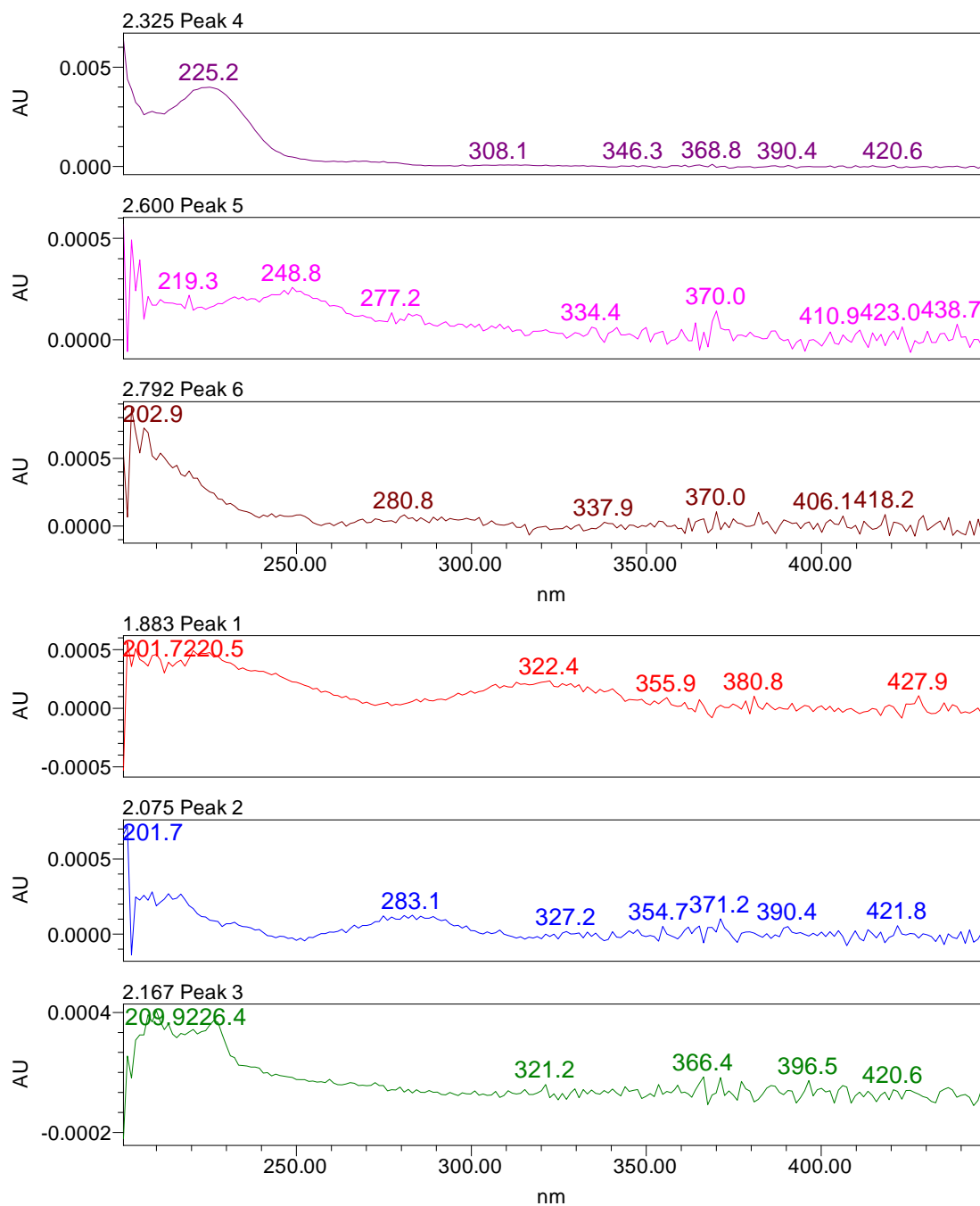


Figura 74: Espectre UV-Visible mostra R28

#### Annex IV.X Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R29

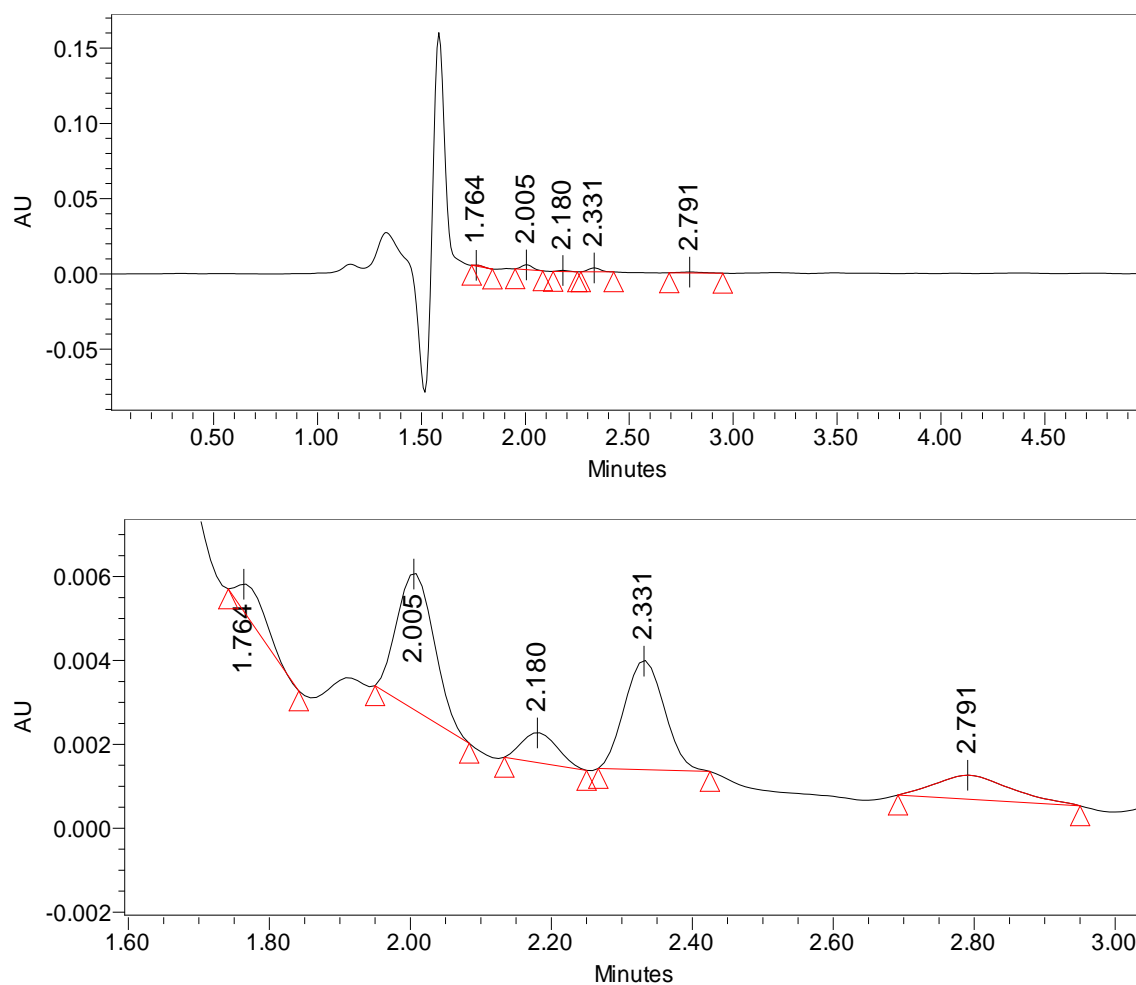


Figura 75: Cromatograma mostra R29

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.76375412	2232.05815	7.13927381
2		2.00498964	11979.4933	38.3166014
3		2.18025309	2520.99229	8.06343429
4		2.33145282	10232.3233	32.7282502
5		2.79067273	4299.63149	13.7524403

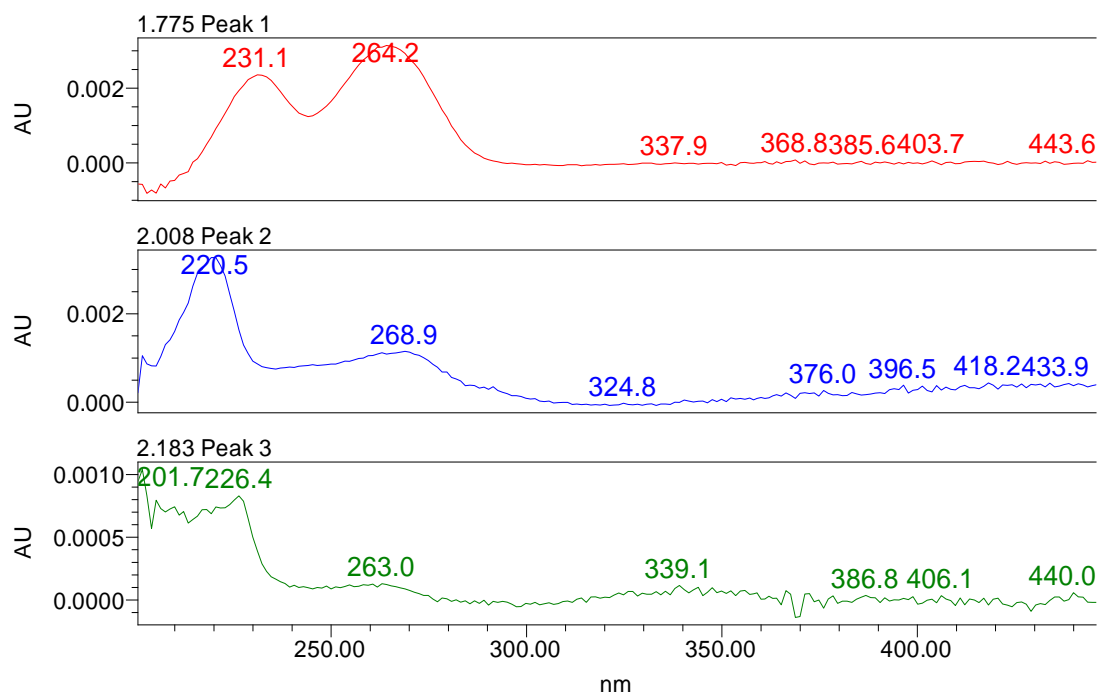
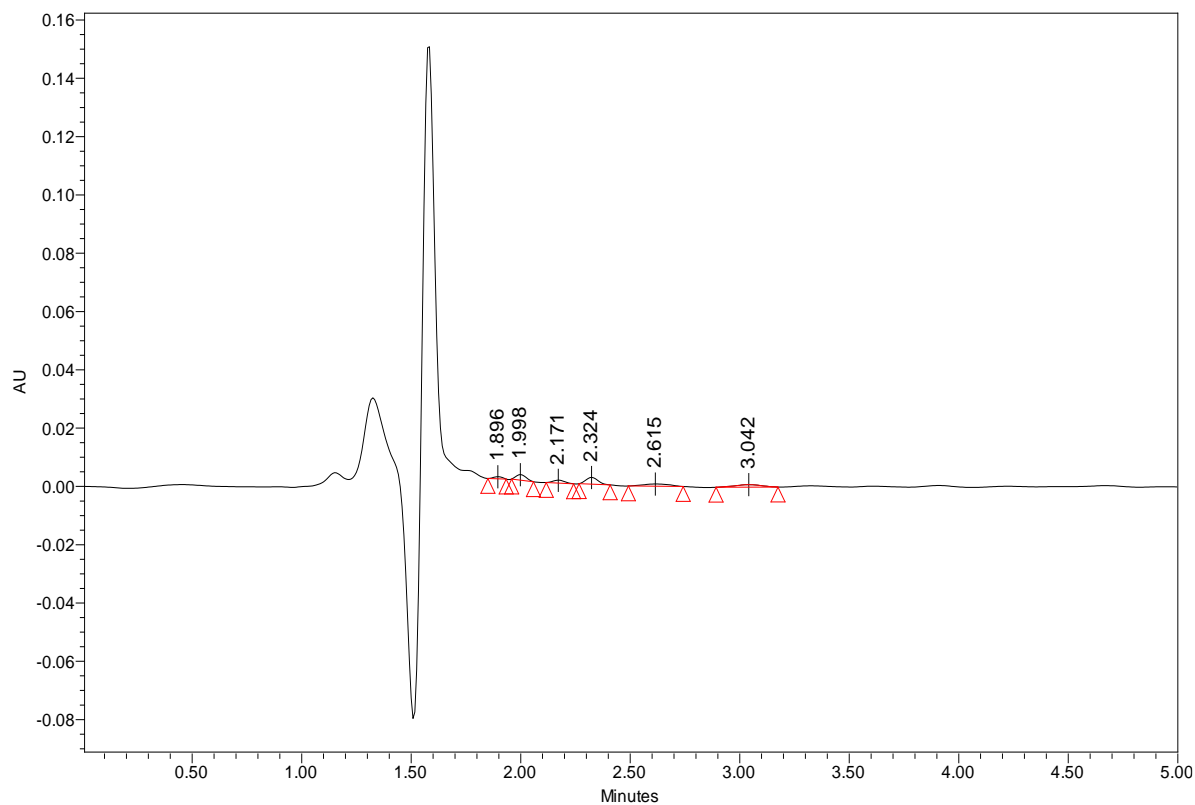


Figura 76: Espectre UV-Visible mostra R29



## Annex IV.XI Cromatograma i espectre UV-VIS mostra R30



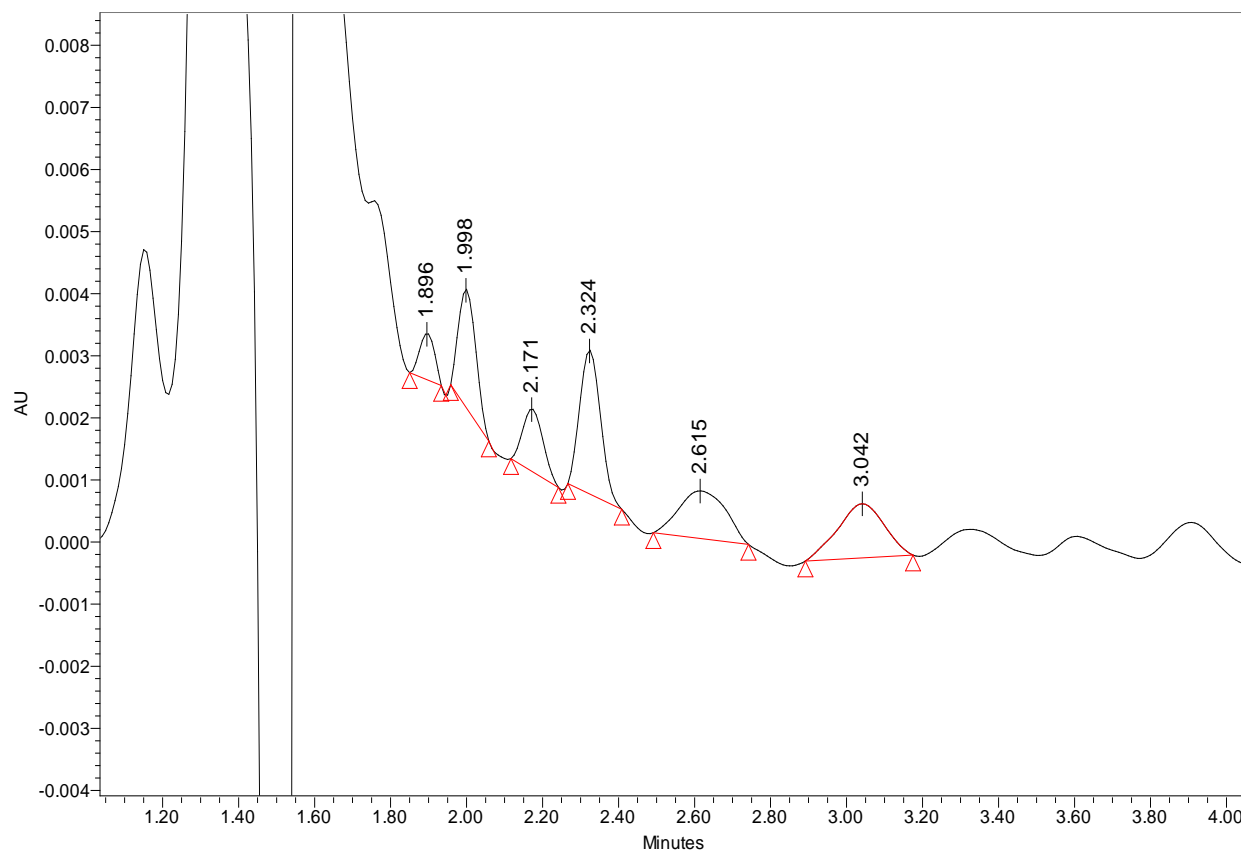


Figura 77: Cromatograma mostra R30

	Name	Retention Time	Area	% Area
1		1.895611316	2025.62372	5.85257291
2		1.998353846	6035.14065	17.437148
3		2.171474991	3745.17952	10.8208331
4		2.323536784	8805.06744	25.4402131
5	Penicilin G	2.614562346	6545.8484	18.9127203
6		3.041669981	7453.96451	21.5365126

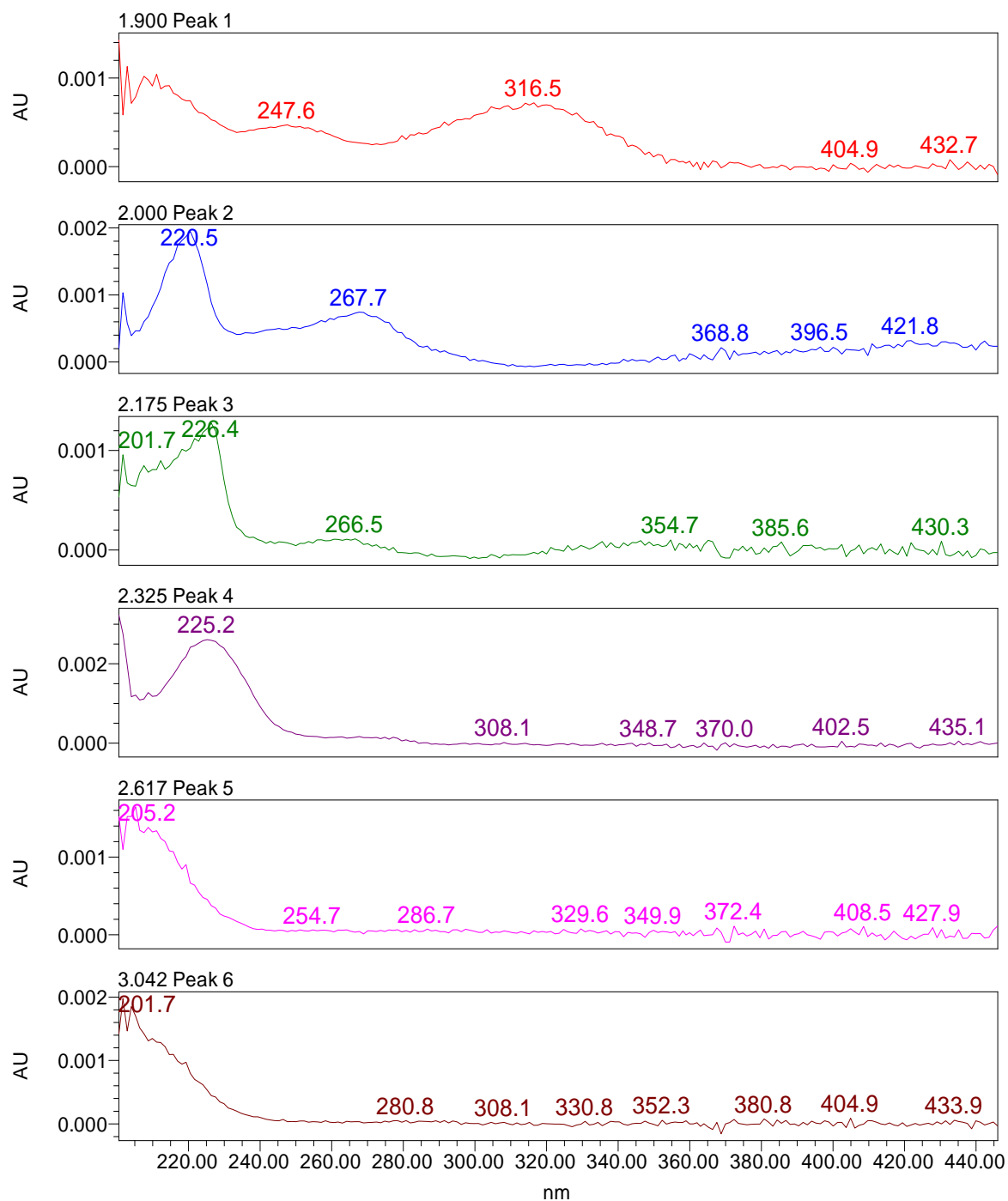


Figura 78: Espectre UV-Visible R30